



Practitioner's Docket N . 60130 (71987)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application: S. Lin et al.  
U.S. Serial No.: 10/690,992                      Group No.: Unknown  
Filed: October 21, 2003                      Examiner: Unknown  
For: METHOD FOR EXTRACTING ANTINEOPLASTIC COMPONENTS  
FROM BUPLEURUM SCORZONERIFOLIUM

**Commissioner for Patents**  
**P.O. Box 1450**  
**Alexandria, VA 22313-1450**

**TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY**

CERTIFICATE OF MAILING	
I hereby certify that this correspondence and the documents referred to as attached therein are being deposited with the United States Postal Service on this date <b>December 2, 2003</b> in an envelope as First Class Mail, addressed to the: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.	
Date: December 2, 2003	By: <u>Michelle P. Chicos</u> Michelle P. Chicos

Attached please find the certified copy of the foreign application from which priority is claimed for this case:

**Country:** Taiwan  
**Application Number:** 092119380  
**Filing Date:** July 16, 2003

**WARNING:** "When a document that is required by statute to be certified must be filed, a copy, including a photocopy or facsimile transmission of the certification is not acceptable." 37 C.F.R. section 1.4(f) (emphasis added).

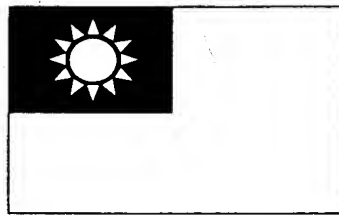
**SIGNATURE OF PRACTITIONER**

Date: December 2, 2003

Tel. No. (617) 439-4444  
Fax. No. (617) 439-4170

Steven M. Jensen (Reg. No. 42,693)  
EDWARDS & ANGELL, LLP  
P. O. Box 9169  
Boston, MA 02209

**NOTE:** "The claim to priority need be in no special form and may be made by the attorney or agent, if the foreign application is referred to in the oath or declaration, as required by section 1.63." 37 C.F.R. section 1.55(a).



# 中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，  
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this  
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請 日：西元 2003 年 07 月 16 日  
Application Date

申請 案) 號：092119380  
Application No.

申請 人：財團法人佛教慈濟綜合醫院  
Applicant(s)

局 長  
Director General

蔡 練 生

發文日期：西元 2003 年 11 月 11 日  
Issue Date

發文字號：  
Serial No. 09221139750

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：

※申請日期：92.07.16

※IPC 分類：

壹、發明名稱：(中文/英文)

抗惡性腫瘤南柴胡萃取物之製備方法

Method For Extracting Antineoplastic Components From

*Bupleurum scorzonerifolium*

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

財團法人佛教慈濟綜合醫院

代表人：(中文/英文) 林欣榮

住居所或營業所地址：(中文/英文)

花蓮市中央路三段 707 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 林欣榮 2. 韓鴻志

住居所地址：(中文/英文)

1. 台北市北投區奇岩里 21 鄰奇岩路 195 巷 5 號 3 樓

2. 台北縣板橋市光華街光華里 18 巷 2 號 2 樓

國 籍：(中文/英文) 1. 2. 中華民國/R.O.C.

#### 肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

## 伍、中文發明摘要：

一種萃取自南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium*)，用於治療細胞增生性疾病 (Cell Proliferative Disorder) 之柴胡萃取物及其萃取方法，該柴胡萃取物之活性成份至少包括以  $\gamma$ -丁內酯為核心，碳 2(5) 位置呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物，以及包含於該雜環化合物中之新穎分子“柴胡內酯 (Chaihulactone)、異柴胡內酯 (Isochaihulactone)、柴胡內酯類似物及其衍生物”，由藥物毒性試驗、細胞特性、動物試驗以及組織切片等結果可知，南柴胡中分離出來之萃取物對於肝癌、肺癌、卵巢癌、大腸直腸癌或惡性腦膠質細胞瘤等癌細胞具抑制效果，並且能夠在不損傷正常細胞的情況下，高度專一性地毒殺化療後期對於紫杉類 (Taxane) 藥物具抗藥性之腫瘤細胞，而作為新一代腫瘤抑制劑之藥物篩選來源。

## 陸、英文發明摘要：

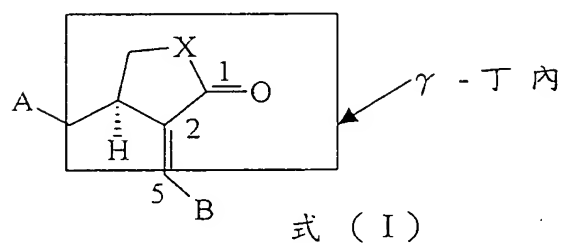
柒、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第 ( 13A ) 圖。

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

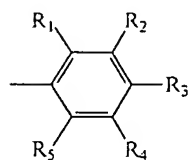
(該代表圖無元件符號及其所代表之意義)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



其中， $X = N, O, S, Se$ ；

A, B 係分別選自具有下式之取代基：



其中， $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  係分別選自氫原子、鹵原子、  
羥基、硫氫基、胺基、烷氧基及硝基。

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】：

本發明係關於一種應用在癌症治療領域，從天然物中萃取出治療細胞增生性疾病（Cell Proliferative Disorder）之植物萃取物及其萃取方法，尤指一種分離自南柴胡（*Bupleurum scorzonerifolium*），並以具  $\gamma$ -丁內酯（ $\gamma$ -Butyrolactone）核心之雜環化合物作為治療人類肝癌（Hepatoma）、肺癌（Lung cancer）、卵巢癌（Ovarian cancer）、惡性腦膠質細胞瘤（Human Malignant Glioblastoma）以及大腸直腸癌（Colorectal Cancer）等癌細胞的主要活性成份之南柴胡萃取物及其萃取方法。

### 【先前技術】：

癌症，一種細胞增生性疾病，已經成為十大死亡原因之首。根據 Boring 等人 1993 年的統計，美國每年約有五十二萬六千人死於癌症，以女性癌症之首乳癌（Breast Cancer）為例，幾已成為 40 至 55 歲婦女的主要殺手。且隨著環境污染日益嚴重，卵巢癌（Ovarian Carcinoma）、肺癌以及肝癌等實體癌（Solid Tumor）以及皮膚癌等患者也明顯增多。根據 Fitzpatrick 等人 1986 年的研究，今日的癌症患者人數與 1945 年相較，足足多出六倍，顯見癌症的偵測與治療實在是刻不容緩。

惟根據目前癌症的研究發現，真核細胞（Eukaryocyte）的細胞老化（Senescence）、複製（Replication）以及分裂（Division）都會遵循細胞週期（Cell Cycle）的模式予以

調控。其中，當細胞進行複製時，攜帶基因的染色體 (Chromosome) 其去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 含量會由  $2N$  倍增成  $4N$ ，以於有絲分裂 (Mitosis) 後產生兩個  $2N$  子細胞 (Daughter Cell)。1995 年 Blackburn 等人指出，真核細胞分裂時，染色體末端會重複一段稱作“端粒 (Telomere)”的固定序列。以人類細胞為例，人類染色體末端的端粒會重複固定 5'-TTAGGG 序列。從目前研究結果得知，“端粒”與細胞週期的時程 (Cell Clock) 調控有關，隨著有絲分裂次數增加，端粒會逐漸變短，當端粒縮短到一定長度時，染色體末端覆蓋的端粒很容易黏結而導致染色體配對異常，甚至造成細胞死亡 (Cell death)。

1995 年 Feng 等人在胚細胞 (Germ-line Cell)、幹細胞 (Stem Cell) 及腫瘤細胞 (Tumor Cell) 等旺盛分裂的細胞中發現，這些細胞染色體末端的端粒上附著有一種稱為“端粒酶 (Telomerase)”的核糖蛋白複合體 (Ribonucleoprotein Complex)，端粒酶的作用在於維持端粒長度，避免端粒歷經多次有絲分裂而變短，因此，端粒酶的存在可以幫助細胞跳脫細胞週期限制而走向不死化。

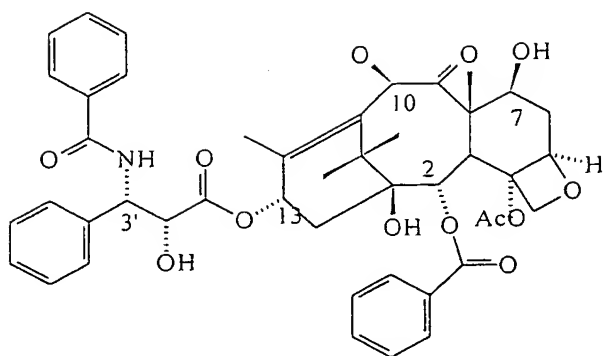
若進一步以 TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) Assay 測試染色體端粒酶活性 (Telomerase Activity) 更發現，在腫瘤細胞或分化不完全的細胞株 (如胚細胞、幹細胞等) 中，端粒酶的活性很高，但在骨髓細胞及生殖細胞以外的正常體細胞則幾乎沒有端粒酶活性；又，1994 及 1995 年 Kim 及 Broccoli 等人亦證實，端粒酶



在協助腫瘤細胞閃躲細胞程式化死亡調控的連鎖機制 (Apoptotic Cascade) 中扮演重要角色，因此，以端粒酶活性作為抗癌藥物的偵測標的，可以有效取代傳統化學標的，準確地偵測藥物對於腫瘤細胞的毒殺情形，而使得檢測端粒酶活性幾已成為測試抗癌藥物治療功效的高專一性 (Specificity) 指標。

另一方面，根據中醫界多年來臨床治療經驗，將臨床上認為具有抗癌功效之五、六十種中藥材，經 TRAP 活性篩選後發現，柴胡、黃柏、人參、甘草、當歸、龍膽及黃芩等中藥材對於惡性腫瘤具有明顯的治療效果。同時，將中藥與目前抗癌藥物相較，亦發現中藥造成患者的副作用（如白血球數量減少、惡病質 (Cachexia) 等）較為緩和，因此，從中藥裡萃取出具腫瘤抑制功效之活性成份，極可能作為新型抗癌藥物的篩選來源。

此外，以現今廣泛用來治療轉移性實體癌的化學治療劑 (Chemotherapeutic Agent) “紫杉醇 (Paclitaxel, 商品名 TAXOL)” 為例，紫杉醇最早係從太平洋紫杉木 (Pacific Yew Tree) 萃取而得，化學式如下式所示：(分子式  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ，分子量 854，以二萜類 (Diterpene) 結構為核心)



紫杉醇 (Paclitaxel) 主要應用於治療卵巢癌 (Ovarian Cancer)、轉移性乳癌 (Metastatic Breast Cancer)、肺癌 (Lung Cancer) 以及黑色素細胞瘤 (Melanoma) 等癌症，其毒殺腫瘤細胞之作用機轉，係藉由紫杉醇以 1:1 比例結合細胞骨架 (Cytoskeleton) 內的  $\beta$  微小管 ( $\beta$ -tubulin) 來抑制微小管 (Microtubule) 的去聚合作用 (Depolymerization)，藉此阻斷有絲分裂 (Mitosis) 完成以啟動腫瘤細胞凋亡 (Blafosklonny et. al, 1995)。因此，使用紫杉類 (Taxane) 藥物治療卵巢癌之初，可以有效殺死腫瘤細胞，而使患者的兩年存活率提高約 15%。

但是，隨著療程延長，臨床上發現腫瘤細胞對於紫杉醇會逐漸產生抗藥性。尤其，從最近研究發現，部分具紫杉醇抗藥性之腫瘤細胞株在  $\beta$  微小管的表現 (Expression) 及電泳移動性 (Electrophoretic Mobility) 上明顯不同於傳統腫瘤細胞。根據 1995 年 Rao 等人的研究可知，這些腫瘤細胞 (如人類肺癌細胞株 AT-12) 會改變組成  $\beta$  微小管的六個次單體構型 (Subunit Configuration)，使紫杉醇不僅無法與  $\beta$  微小管結合，反會被細胞當作外來物排除

(Ion-pumping)，致使腫瘤細胞對於紫杉醇逐漸產生抗藥性而在化療後期逐漸失效。

並且，以現存其他抗癌藥物，如 5-氟嘧啶二酮 (5-Fluorouracil)、埃波黴素 (Epothilone)、順雙胺雙氯鉑 (Cisdiammine Dichloroplatinum, 俗稱 Cisplatin)、甲基苄胍 (Procarbazine) 以及環磷胺 (Cyclophosphamide) 等單獨使用或併用紫杉醇來治療對於紫杉類藥物具抗藥性之患者，臨床治療效果不佳，且從細胞實驗來看亦發現目前的抗癌藥物難以抑制紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株 (Taxol-resistance Tumor Cell Line) 增生。然如提高藥物投予劑量，例如將紫杉醇劑量調高到每公斤 300 毫克注射大白鼠時，紫杉醇產生的細胞毒性 (Cytotoxicity) 很強，往往於用藥後造成正常細胞大量壞死 (Necrosis)。

是故，為增進化療後期癌細胞的毒殺效果，從臨床上初見抗癌功效的中藥材裡發展出能有效抑制紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株之抗癌藥物，已成為醫界的當務之急。

#### 【發明內容】：

本發明之主要目的在於提供一種萃取自南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.)，用於抑制紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株 (Taxol-resistance Tumor Cell Line) 之具  $\gamma$ -丁內酯 ( $\gamma$ -Butyrolactone) 核心雜環化合物或其藥物上可接受之鹽、酯、酮及其衍生物，以及萃取此等雜環化合物及其衍生物之萃取方法。

本發明之另一目的在於提供一種由南柴胡生藥中分

離出具腫瘤細胞抑制效果，以新穎化合物異柴胡內酯 (Isochaihulactone) 為首之柴胡內酯 (Chaihulactone) 類似物 (Analogues) 及其衍生物或其藥物上可接受之鹽、酯、酮與其衍生物之萃取方法。

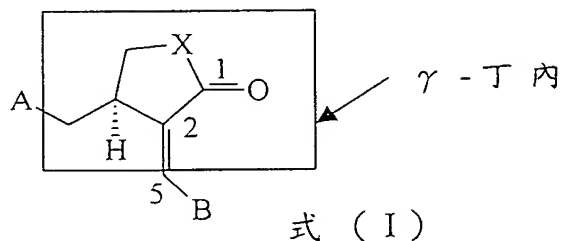
本發明之再一目的在於提供一種由南柴胡生藥中分離出可抑制人類肝癌、卵巢癌、惡性腦瘤、肺癌及大腸直腸癌之具  $\gamma$ -丁內酯 ( $\gamma$ -Butyrolactone) 核心之雜環化合物或其藥物上可接受之鹽、酯、酮，與其衍生物之萃取方法。

本發明之又一目的在於提供一種在不影響正常肝腎功能的情況下，發展出對紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株具高度專一性毒殺效果之南柴胡萃取物及其萃取方法，其中，該南柴胡萃取物進一步包含有以  $\gamma$ -丁內酯 ( $\gamma$ -Butyrolactone) 為核心之雜環化合物，或其藥物上可接受之鹽、酯、酮與其衍生物。

鑑於上述及其他目的，本發明之腫瘤抑制物質及其萃取方法，係包括含有分離自南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.)，用於治療肺癌、卵巢癌、肝癌、人類惡性腦膠質細胞瘤或大腸直腸癌之南柴胡萃取物及其萃取方法，以及從南柴胡粗萃取物 (Crude Extracts) 中進一步分離出來的腫瘤抑制成份，或藥物上可接受之鹽、酯、酮或其衍生物。

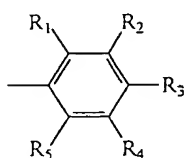
該南柴胡萃取物之腫瘤抑制成份主要包含一種如通式 (I) 代表，以  $\gamma$ -丁內酯 ( $\gamma$ -Butyrolactone) 為核心，

並在碳-2 (5) 為 Z 構型或 E 構型之雜環化合物或其藥物上可接受之鹽、酯、酮與其衍生物：



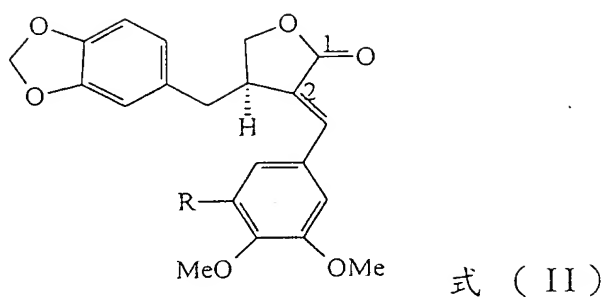
其中， $X = N, O, S, Se$ ；

A, B 係分別選自具有下式之取代基：

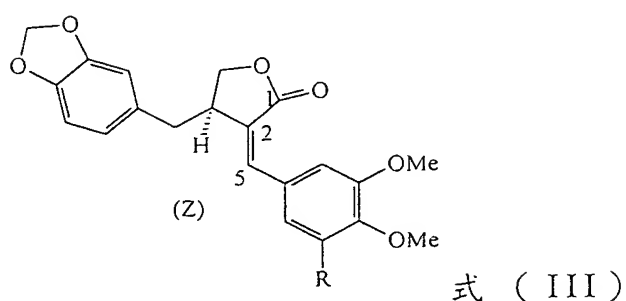


其中， $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  係分別選自氫原子、鹵原子、羥基、硫氫基、胺基、烷氧基及硝基。

同時，式 (I) 中復包括一種如通式 (II) 及通式 (III) 所示，首次公開並且分別命名為柴胡內酯 (Chaihulactone)、異柴胡內酯 (Isochaihulactone) 及其類似物之雜環化合物。其中，該柴胡內酯、異柴胡內酯以及該柴胡內酯類似物及其衍生物係屬於存在於南柴胡之木脂素 (Lignan)。比較式 (I)、式 (II) 及式 (III) 可知，柴胡內酯、異柴胡內酯均為一種以  $\gamma$ -丁內酯結構為核心，且碳 2-(5) 呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物。



其中，R 代表烷氧基。



其中，R 代表氫原子、烷氧基或芳基。

從本發明實施例之實驗結果發現，以不同溶劑（如丙酮、甲醇水溶液等）分離南柴胡中含有  $\gamma$ -丁內酯結構等雜環化合物的萃取物，均可以有效抑制腫瘤細胞增生，且以南柴胡丙酮粗提取物的腫瘤抑制效果最佳。而且，利用層析法（Chromatography）進一步分離該南柴胡丙酮粗提取物，並分析各濃縮物的分子結構，可以得到新穎雜環化合物“柴胡內酯、異柴胡內酯、柴胡內酯相關類似物及其衍生物”。

根據本發明較佳實施例實驗結果，將南柴胡萃取物中分離出來的柴胡內酯（Chaihulactone）、異柴胡內酯（Isochaihulactone）、柴胡內酯類似物及其衍生物加入人類肺癌、肝癌、惡性腦膠質細胞瘤及大腸癌細胞株以後發

現，腫瘤細胞株的端粒酶活性 (Telomerase Activity) 較未加藥之控制組明顯減少約 5 倍，尤其係紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株 (Taxol-resistance Tumor Cell Line) 的端粒酶活性在南柴胡萃取物添加之後，可以產生明顯的毒殺效果，顯示本發明所提供之南柴胡萃取物裡確實含有腫瘤抑制成份，且該腫瘤抑制成份係包括以  $\gamma$ -丁內酯結構為核心，丁內酯核心之碳 2(5) 處呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物，或其藥物上可接受之鹽、酯、酮與其衍生物，其中又以新發現之柴胡內酯 (Chaihulactone)、異柴胡內酯 (Isochaihulactone) 及其衍生物其腫瘤毒殺效果最為顯著，因此，本發明係將以異柴胡內酯為首之雜環化合物作為腫瘤抑制物質 (Antineoplastic Agent) 之主要活性成份。

以下即揭示從南柴胡中分離出具腫瘤抑制功效之  $\gamma$ -丁內酯雜環化合物及其衍生物之萃取方法。該萃取方法包含兩階段，第一階段係以極性 (Polarity) 互異的溶劑將南柴胡生藥分離出不同萃取層，而第二階段則是以層析法 (Chromatography) 分離特定萃取層以得到單一類型之南柴胡萃取物。以下即逐步說明南柴胡生藥萃取出腫瘤抑制成份之方法：

以丙酮 (Acetone) 浸泡並攪拌南柴胡粉末，反覆抽取濃縮得到南柴胡丙酮粗萃取物 ( *Bupleurum scorzonerifolium*-Acetone Crude Extract, 簡稱為 BS-A 層 ) 後，將殘渣以甲醇抽取得到南柴胡甲醇粗萃取物 ( 簡稱為 BS-M 層 )，復以水抽取殘渣以得到南柴胡水層萃取物 ( 簡

稱為 BS-W 層)；

將 BS-A 層溶解於甲醇水溶液，經過正己烷( n-Hexane) 萃取後，分離取得南柴胡正己烷層(簡稱為 BS-H 層)以及南柴胡甲醇水層；

脫除南柴胡甲醇水層中之甲醇，並以氯仿(Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ )重複萃取濃縮；

以層析法(Chromatography)分離該南柴胡氯仿萃取物，並分別收集不同濃度之甲醇/二氯甲烷沖提層(Elution)予以濃縮；

將不同濃度之甲醇/二氯甲烷沖提層各以層析法分離純化，以得到單一類型之化合物。

由於依上述方法得到的南柴胡丙酮粗提取物(BS-A)、南柴胡甲醇粗提取物(BS-M)、5%甲醇/二氯甲烷沖提層以及層析收集物等加入腫瘤細胞株培養後均發現明顯腫瘤毒殺效果，且以質譜(Mass Spectrum)及核磁共振圖譜(Nuclear Magnetic Resonance Spectrum)鑑定南柴胡中具腫瘤抑制活性之化合物結構，亦顯示此等化合物均具有 $\gamma$ -丁內酯結構，由此可證本發明之萃取方法抽取南柴胡，確能有效保留藥材中藥材中的腫瘤抑制成份。

再者，以 TRAP Assay 檢測腫瘤細胞株加入南柴胡萃取物以後，端粒酶(Telomerase)的活性抑制情形，結果發現南柴胡丙酮粗提取物可以有效抑制人類肺癌細胞株 A549 的端粒酶活性及 hTERT 訊息核糖核酸之表現，顯示南柴胡丙酮粗提取物對於癌細胞可能具有高度專一性的毒



殺效果。

尤其，將含有以  $\gamma$ -丁內酯為核心之雜環化合物的南柴胡丙酮粗提取物以及從南柴胡萃取物分離出來之柴胡內酯類似物與其衍生物加入紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株 (Taxol-resistance Tumor Cell Line)，例如 A549-T12 (對紫杉醇具抗藥性之人類肺癌細胞株)，亦發現南柴胡萃取物中的  $\gamma$ -丁內酯核心雜環化合物及其衍生物會誘發紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株產生細胞凋亡 (Apoptosis)；且從流式細胞儀 (Flow Cytometer) 及西方點墨法 (Western Blot) 結果進一步探討南柴胡萃取物的作用機轉，亦發現當腫瘤細胞株加入南柴胡萃取物以後，該南柴胡萃取物會誘導細胞大量生產 p21 及 p53 等腫瘤抑制蛋白 (Tumor Suppressor)，使腫瘤細胞停滯在有絲分裂後期 (高 G2/M 比例) 的紡垂絲聚合狀態 (Spindle Polymerization)。故，由細胞調控 (Cell Regulation) 的觀點來看，南柴胡丙酮粗萃取物及其內所含以  $\gamma$ -丁內酯 ( $\gamma$ -Butyrolactone) 為核心之雜環化合物可視為一種用於抑制有絲分裂之微小管穩定劑 (Microtubule Stabilizing Agent)，其作用機轉與紫杉醇 (Paclitaxel) 類似，均具有促進微小管聚合 (Microtubule Polymerization) 之功效，使增生的腫瘤細胞停滯在 G2/M 期，變成無效細胞 (Junk Cell) 而導致細胞凋亡。

#### 【實施方式】：

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方式，熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容輕易地

瞭解本發明之其他優點與功效。本發明亦可藉由其他不同的具體實施例加以施行或應用，本說明書中的各項細節亦可基於不同觀點與應用，在不悖離本發明之精神下進行各種修飾與變更。

本發明至少包含三部分：

一為從南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd) 生藥中萃取出對於人類肝癌細胞株 J5、卵巢癌細胞株 OVCAR-3、惡性腦膠質細胞瘤細胞株 DBTRG-05MD、肺癌細胞株 A549 及大腸直腸癌細胞株 HT29 具抑制功效之天然萃取物之南柴胡萃取方法。

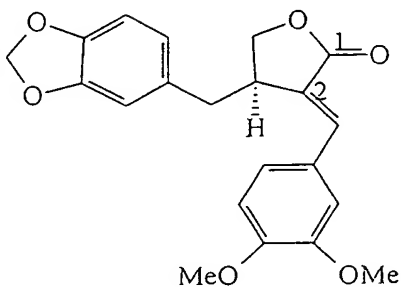
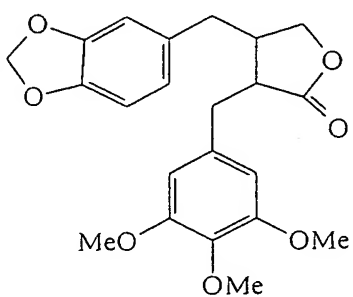
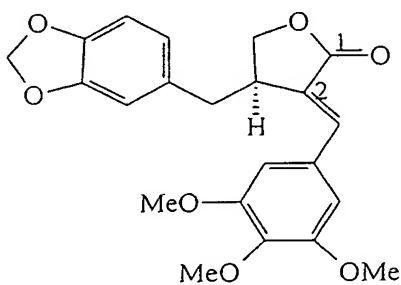
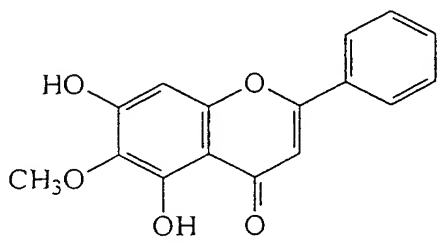
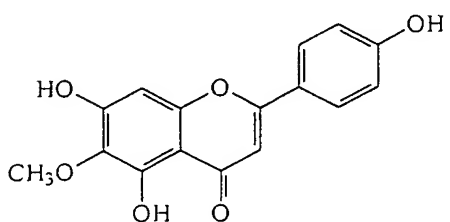
其二係按照此等萃取方法，從南柴胡萃取物中分離出以  $\gamma$ -丁內酯為核心，且碳 2(5)位置呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物，以及形成此等雜環化合物在藥物上可接受之鹽、酯、酮及其類似衍生物。其中，該雜環化合物中進一步包括有新穎化合物：柴胡內酯 (Chaihulactone)、異柴胡內酯 (Isochaihulactone)、以及與柴胡內酯相關之類似物及其衍生物。

而第三部份則是將具有  $\gamma$ -丁內酯核心雜環化合物之南柴胡丙酮粗抽取物、柴胡內酯、異柴胡內酯、柴胡內酯類似物及其衍生物，或其藥物上可接受之鹽、酯、酮等加至腫瘤細胞株來檢驗體內 (in vivo) 及體外 (in vitro) 環境下，各南柴胡萃取物對於腫瘤細胞株的抑制效果，復運用動物模式進一步評估南柴胡萃取物對於生物體正常細胞及腫瘤細胞的影響，以檢視活體狀態下，南柴胡萃取物對

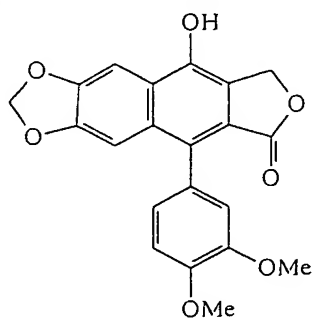
於肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦瘤或大腸直腸癌的抑癌效果。

根據本發明較佳實施例所採用之南柴胡抽取方法，該方法係將生藥南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium*) 粉碎後浸泡於丙酮 (Acetone)，經過四次反覆攪拌、抽取及濃縮而取得南柴胡丙酮粗抽取物 (BS-A 層) 後，將殘渣以甲醇抽取得到南柴胡甲醇粗抽取物 (簡稱為 BS-M 層)，再用水抽取殘渣以得到南柴胡水層抽取物 (簡稱為 BS-W 層)；之後，將南柴胡丙酮粗抽取物溶解於甲醇水溶液，經過正己烷 (n-Hexane) 粗抽後，分離取得南柴胡正己烷層 (簡稱為 BS-H 層) 以及南柴胡甲醇水層；而後，脫除南柴胡甲醇水層中之甲醇，並以氯仿 (Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ ) 重複萃取濃縮取得南柴胡氯仿萃取物；而後，利用層析法 (Chromatography) 分離該南柴胡氯仿萃取物，並且分別收集不同濃度之甲醇/二氯甲烷沖提層 (Elution) 進行濃縮；最後，以層析法 (如矽膠柱層析法 (Silica Gel Chromatography)、製備型高效能液相層析法 (preparative HPLC) 等) 將甲醇/二氯甲烷沖提層分離純化，俾取得單一類型之化合物。

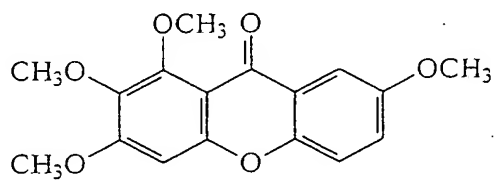
從層析法分離出來的單離化合物，經過質譜 (Mass Spectrum) 及核磁共振圖譜 (Nuclear Magnetic Resource Spectrum) 鑑定各單類化合物的分子量以及結構，可得到如下表所示之雜環化合物：

層析法分離成份	結構式	分子量以及結構判定
第一成份		368.39 Kaeophyllin
第二成份		398.41
第三成份		398.41 Chaihulactone
第四成份		284.27
第五成份		284.27

第六成份

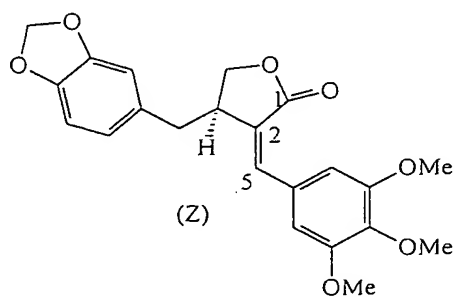


第七成份



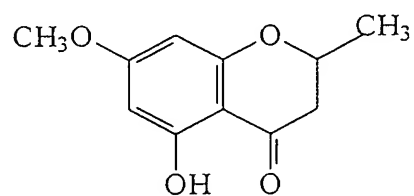
300

第八成份



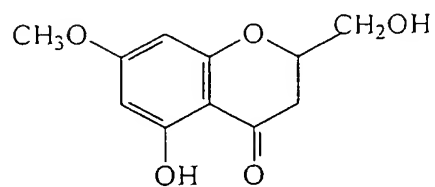
398.41  
Isochaihul  
actone

第九成份

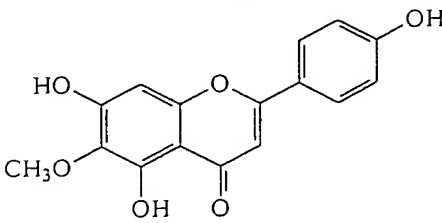
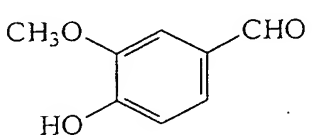
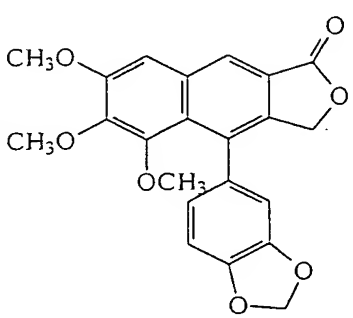
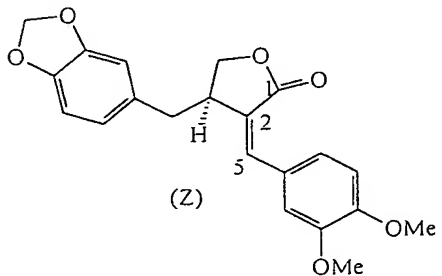


206.20

第十成份



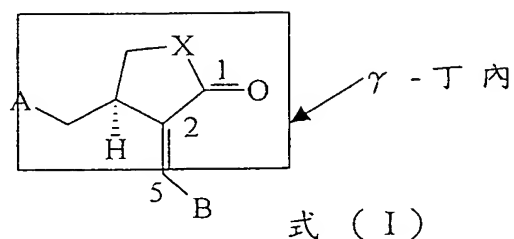
222.20

第十二成份		300
第十三成份		152.14
第十四成份		Chaihunaphthone
第十五成份		Isokaeophyllin

將南柴胡各萃取層以及分離自南柴胡丙酮粗抽物中之上述雜環化合物分別施予藥物篩選，可得知南柴胡生藥中所含有之腫瘤抑制成份主要保留在南柴胡丙酮粗抽取物以及南柴胡甲醇水層，南柴胡正己烷層以及經氣仿處理後分離之南柴胡水層幾乎不具腫瘤抑制功效。而且，經層析法（如低壓液相層析或製備型高效能液相層析法（preparative High Performance Liquid Chromatography,

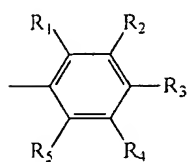
preparative HPLC))進一步純化，可以分段收集各沖提層，以濃縮後得到上述各類單一化合物。

惟從本發明較佳實施例之藥物篩選結果發現，在層析法分離出來的各種上述成份中，第三成份、第八成份對於人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦瘤以及大腸直腸癌細胞株的腫瘤毒殺效果最為顯著。而且，進一步分析具腫瘤效果之第三、第八成份之主要代表性分子結構，亦可得知南柴胡萃取物中之抑癌有效成份其分子主要特徵係如通式(I)所示，俱具有 $\gamma$ -丁內酯( $\gamma$ -Butyrolactone)核心，且以具有 $\gamma$ -丁內酯結構，同時碳-2(5)位置呈Z構型或E構型之雜環化合物或其藥物上可接受之鹽、酯、酮與其衍生物作為抑制腫瘤增生的主要活性成份。



其中， $X = N, O, S, Se$ ；

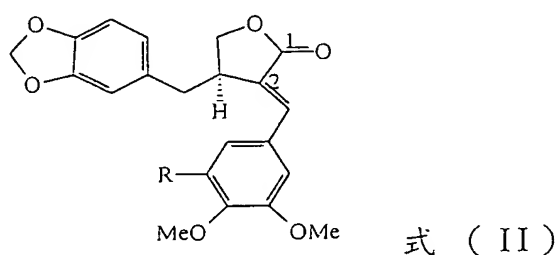
A, B 係分別選自具有下式之取代基：



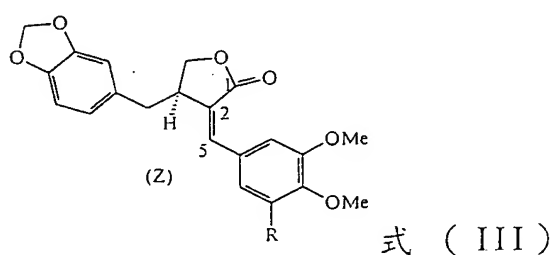
其中， $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  係分別選自氫原子、鹵原子、羥基、硫氫基、胺基、烷氧基及硝基。

若進一步分析純化合物中，第三成份、第八成份、第

十四成份以及第十五成份之分子結構，亦可知南柴胡萃取物中包括有一類首次公開並且命名為柴胡內酯 (Chaihulactone)、異柴胡內酯 (Isochaihulactone) 以及與該柴胡內酯相關類似物或衍生物，如柴胡奈酮 (Chaihunaphthone) 等之新穎雜環化合物。其中，該柴胡內酯以及異柴胡內酯均是以  $\gamma$ -丁內酯為碳骨架核心，並於碳-2(5)位置形成 Z 構型之雜環化合物，該柴胡內酯類似物及異柴胡內酯類似物之通式分別如式 (II) 及式 (III) 所示：



其中，R 代表烷氧基。



其中，R 代表氫原子、烷氧基或芳基。

此新穎雜環化合物柴胡內酯、異柴胡內酯，以及與柴胡內酯相關之類似物及其衍生物係屬於一種存在於南柴胡乾燥物之木脂素 (Lignan)。由於藥物篩選時發現各類南柴胡萃取物中以南柴胡丙酮粗提取物以及第八成份之異柴胡內酯 (Isochaihulactone) 具有最佳之腫瘤抑制效果，因此，



以下所述之較佳實施例遂分別以南柴胡丙酮粗抽取層及第八成份來當作含有  $\gamma$ -丁內酯之南柴胡萃取物，以及南柴胡新穎化合物“柴胡內酯類似物及其衍生物”之活性指標成份。以用來抑制人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦膠質細胞瘤以及大腸直腸癌之功效指標成份。

( $\gamma$ -Butyrolactone) 核心雜環化合物及柴胡內酯類似物之指標，藉以檢測南柴胡萃取物對於細胞株以及生物體內的腫瘤抑制情形。

惟從本發明較佳實施例之組織切片結果，已明白顯示出南柴胡丙酮萃取物能夠有效縮小腫瘤體積 (Tumor Volume)，使腫瘤細胞核發生裂解，淋巴球浸潤而造成腫瘤組織大片壞死。而且，經由動物毒性試驗結果，亦可知投予南柴胡萃取物至哺乳類動物後，體內各項器官功能性指標，例如脂解酶 (Lipase)、澱粉酶 (Amylase)、肌胺酸酐激酶 (Creatinine Kinase)、乳酸脫氫酶 (Lactate Dehydrogenase)、GOT、BUN 等，在投予南柴胡萃取物前後並無顯著差異，但是腫瘤部位的端粒酶活性在投予南柴胡萃取物後卻明顯降低，顯示以本發明之南柴胡丙酮粗抽取物以及新穎化合物“柴胡內酯、異柴胡內酯及柴胡內酯相關類似物與其衍生物”投予哺乳類動物，可在不傷害正常肝腎功能的情況下，可能對於人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦瘤以及大腸直腸癌產生高度專一性 (High Specificity) 的毒殺能力。

另一方面，將具有  $\gamma$ -丁內酯雜環化合物之南柴胡丙酮

粗萃取物，以及自南柴胡萃取物中分離出來的第八成份異柴胡內酯（為柴胡內酯、柴胡內酯類似物及其衍生物之指標成份）投予紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株（例如人類肺癌細胞株 AT-12）後觀察其腫瘤抑制情形。結果顯示經過分離及純化步驟，柴胡內酯、異柴胡內酯之類似物及其衍生物作用於抑制紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株之端粒酶活性的有效濃度（約 1.2 微克/毫升）遠小於南柴胡丙酮萃取物的有效濃度（約 60 微克/毫升），顯示柴胡內酯、異柴胡內酯以及柴胡內酯相關類似物及其衍生物係南柴胡中最主要的腫瘤抑制活性成份，而且，生藥型態的南柴胡經過本發明之萃取方法分離後，其南柴胡萃取物的腫瘤抑制效果更為顯著。

因此，從南柴胡萃取物（尤指南柴胡丙酮粗抽取物、柴胡內酯、異柴胡內酯以及柴胡內酯相關類似物及其衍生物）之藥物作用機轉看來，南柴胡萃取物與紫杉醇類似，係一種用於抑制有絲分裂之微小管穩定劑（Microtubule Stabilizing Agent），然而兩者對於  $\beta$  微小管的作用部位可能不相同。

綜上，從南柴胡中分離出來的新穎化合物“柴胡內酯、異柴胡內酯、柴胡內酯類似物及其衍生物”，在新藥開發上極可能成為新的抗癌藥物來源。

以下之實施例係進一步詳細說明本發明之觀點，但並非以任何觀點限制本發明之範疇。

#### 較佳實施例

現即配合所附圖式詳細說明本發明：(1)具腫瘤抑制功效之南柴胡萃取物，(2)該萃取物所含有之活性成份，(3)從南柴胡生藥裡萃取出南柴胡萃取物，以及(4)南柴胡萃取物中各活性成分之萃取方法，藉以治療人類肝癌 (Hepatoma)、卵巢癌 (Ovarian Cancer)、肺癌 (Lung Cancer)、惡性腦膠質細胞瘤 (Malignant Glioblastoma) 及大腸直腸癌 (Colorectal Carcinoma) 等癌細胞各較佳實施例，惟下述各實施例僅用於顯示本發明之較佳實施態樣，並非用以限制本發明之可實施範疇，且以南柴胡萃取物及其活性成份欲製作成藥物上可接受之鹽、酯、酮及類似物時，其藥物組成、劑型及合成方式均得按實際實施情況進行調整。

#### 實例 1：南柴胡腫瘤抑制 (Antineoplastic) 活性成分之萃取方法

本發明所用之南柴胡為全緣單葉互生，呈複繖花序之狹葉柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd, 我國稱為南柴胡)。經過乾燥及粉碎處理後，於室溫下將 6 公斤的南柴胡粉末浸泡於 20 公升丙酮，攪拌四小時濃縮過濾並且反覆粗抽四次，即取得南柴胡丙酮粗萃取物 (簡稱為 BS-A)，將殘渣以甲醇抽取得到南柴胡甲醇萃取物 (簡稱為 BS-M 層)，再以水抽取殘渣以得到南柴胡水層萃取物 (簡稱為 BS-W 層)。之後，將南柴胡丙酮粗萃取物以 95% 甲醇水溶液溶解，並以正己烷 (n-Hexane) 萃取三次後，分離出南

柴胡正己烷層（簡稱為 BS-H）以及南柴胡甲醇水層，並且加入蒸餾水 500 毫升脫除南柴胡甲醇水層中之甲醇。接著，在脫除甲醇之南柴胡甲醇水層中加入氯仿（Chloroform）進行萃取，經過三次氯仿萃取後分離氯仿層及水層並且合併濃縮，俾製得南柴胡氯仿萃取物（簡稱為 BS-C）。

將南柴胡丙酮粗抽取物（BS-A）、南柴胡甲醇粗抽取物（BS-M）、南柴胡正己烷萃取物（BS-H）、南柴胡氯仿萃取物（BS-C）及南柴胡水層萃取物（BS-W）分別以 MTT Assay 測試不同萃取層所收集之萃取物對於肺癌細胞株 A549 的藥物毒性，結果如第 1 圖所示，在各種南柴胡萃取層中，係以南柴胡丙酮萃取物的腫瘤抑制效果最佳，且按照粗抽物之萃取流程「丙酮粗萃取物→甲醇水萃取物→氯仿萃取物」均含有腫瘤抑制成份。然為從南柴胡萃取物中分離出具有腫瘤抑制效果的成份，本發明於是進一步以層析法（Chromatography）沖提分離該南柴胡氯仿萃取物。

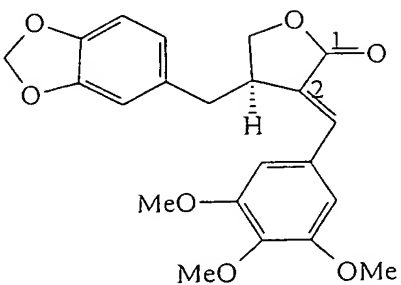
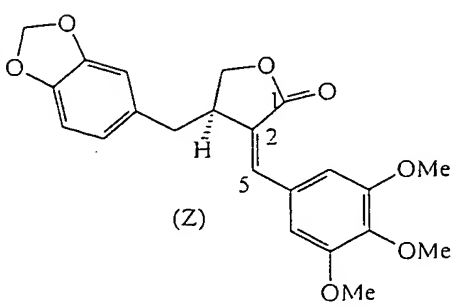
以矽膠層析法（Silica Gel Chromatography）將約 100 克南柴胡氯仿萃取物分別以 5% 甲醇/二氯甲烷、10% 甲醇/二氯甲烷、20% 甲醇/二氯甲烷以及甲醇沖提（Elution）分離，得到 5% 甲醇/二氯甲烷層萃取物 27.5 克、10% 甲醇/二氯甲烷層萃取物 14.04 克、20% 甲醇/二氯甲烷層 10.96 克以及甲醇層萃取物 7.25 克，其中，腫瘤抑制成份主要保留在 5% 甲醇/二氯甲烷層萃取物。而後，以例如矽膠柱層析法、或製備型高效能液相層析法（preperative High

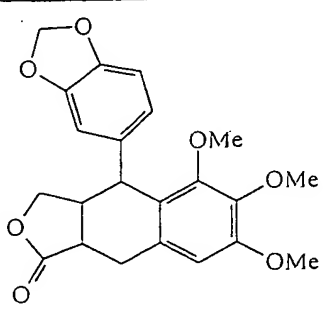
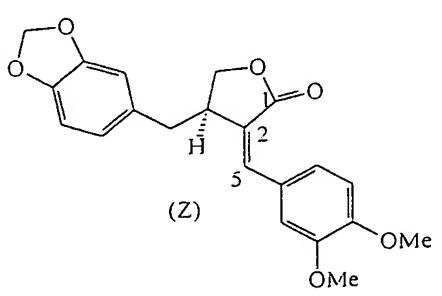
Performance Liquid Chromatography, HPLC)、或中壓液相層析法(Medium Pressure Liquid Chromatography)或 Lobar 等層析技術分離 5% 甲醇/二氯甲烷萃取物，並且濃縮收集出具腫瘤抑制效果之第三成份、第八成份、第十四成份及第十五成份。

### 實例 2：南柴胡腫瘤抑制活性成分之結構

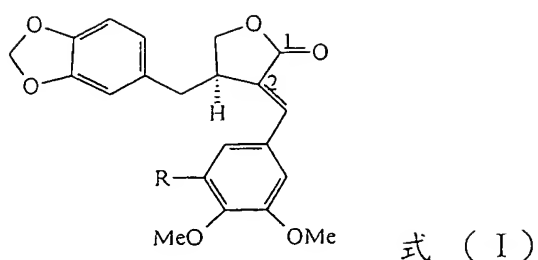
按上述萃取方法從南柴胡丙酮萃取物分離出來之第三成份、第八成份、第十四成份及第十五成份各主要代表物，分別以質譜(Mass Spectrum)及核磁共振圖譜(Nuclear Magnetic Resonance Spectrum, NMR)定義各化合物之分子量及其結構後，其結果如同下表所示：

表 1：南柴胡丙酮萃取物中具腫瘤抑制功效之分離化合物

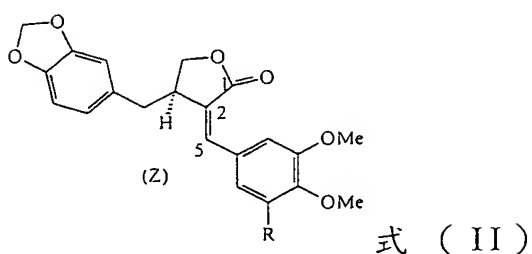
低壓層析法 分離成份	結構式	分子量以 及 結構 判定
第三成份		398.41 Chaihulactone
第八成份		398.41 Isochaihulactone

第十一成份		Chaihunaphthone
第十五成份		Isokaeophyllin

經過分子結構整合歸納發現，對於人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦膠質細胞瘤及大腸直腸癌的腫瘤細胞株具抑制效果之南柴胡萃取物，其化合物碳骨架均係以  $\gamma$ -丁內酯為核心，且在碳 2(5)處呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物 (Heterocyclic Compounds)。而且，由細胞毒性測試結果可知，第三成份及第八成份對於肺癌細胞株的毒殺效果優於其他成份，故將第三及第八成份結晶以後，以氫核磁共振圖譜 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 及碳 13 核磁共振圖譜 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) 進一步分析此兩沖提成份之分子結構，而得到分別如通式 (I) 及通式 (II) 所示，命名為“柴胡內酯 (Chaihulactone)”及“異柴胡內酯 (Isochaihulactone)”之新穎化合物：



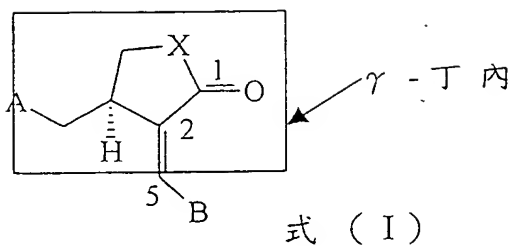
其中，R 代表烷氧基。



其中，R 代表氫原子或烷氧基。

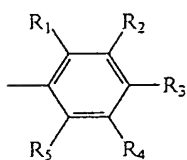
(白色針狀結晶，熔點  $137-138^{\circ}\text{C}$ ， $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -29.0^{\circ}$  (c0.5,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 1745, 1635, 1581, 1335, 1153; UV ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}} \text{nm}$  ( $\log \epsilon$ ): 247(4.08), 298(4.17), 327(4.08))

再而，若進一步分析其他具腫瘤抑制功效之化合物結構，例如前述第一成份、第二成份、第十一成份及第十五成份之代表分子以及相關類似物或其衍生物，並與現行藥物資料庫進行比對。其比對結果發現，南柴胡萃取物中具有腫瘤毒殺效果之醫藥組成物，均為含有  $\gamma$ -丁內酯 ( $\gamma$ -Butyrolactone) 核心結構，且碳-2(5)處呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物，或其藥物上可接受之鹽、酯、酮及其衍生物。該雜環化合物之通式係如式 (I) 所示：

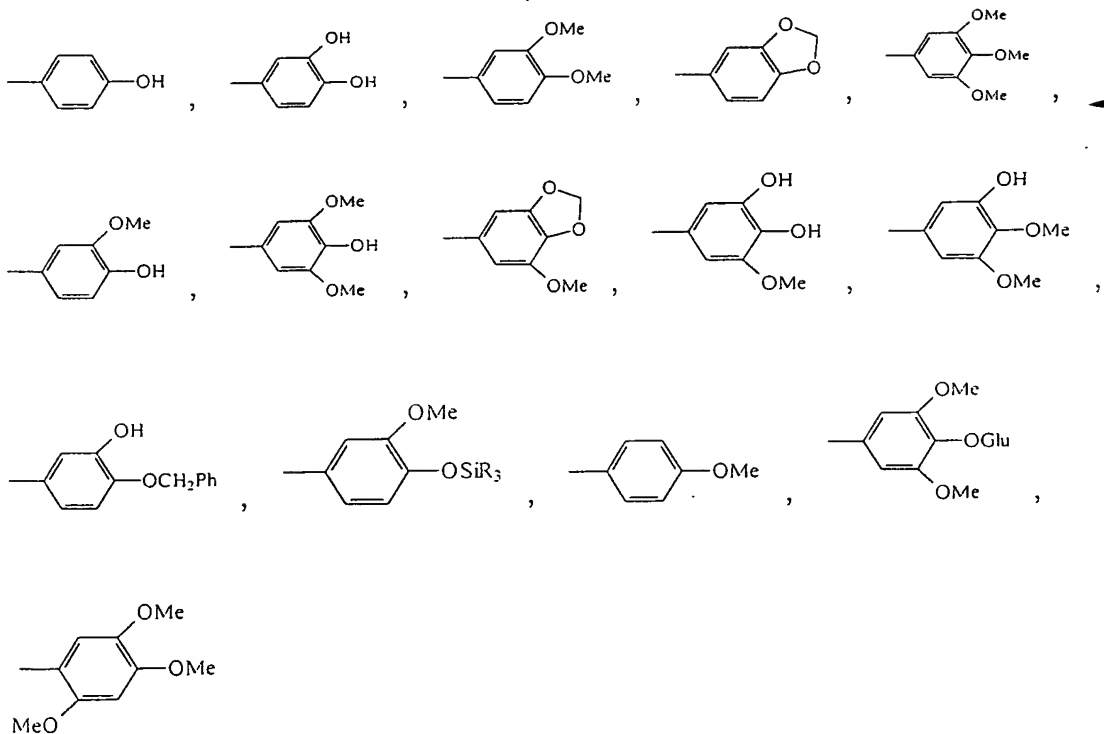


其中， $X = N, O, S, Se$ ；

A, B 係分別選自具有下式之取代基：



其中， $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  係分別選自氫原子、鹵原子、羥基、硫氫基、胺基、烷氧基及硝基；且該取代基係進一步包含以下之取代基結構：





而且，由細胞毒性測試結果可知，第八成份異柴胡內酯對於肺癌細胞株的毒殺效果明顯優於其他柴胡內酯類似物，因此，本發明所包含之下列各實施例，均是以南柴胡丙酮萃取物（BS-A）及第八成份之異柴胡內酯（BS-(8)）作為評估南柴胡腫瘤抑制成份“ $\gamma$ -丁內酯核心，碳 2(5) 呈 Z 構型之雜環化合物”，以及新穎化合物“柴胡內酯、異柴胡內酯、柴胡內酯類似物及其衍生物”功效之指標物質。

### 實例 3：南柴胡萃取物對於細胞增生（Cell Proliferation）之影響

將從南柴胡生藥中萃得之南柴胡丙酮粗抽取物（BS-A）、南柴胡甲醇粗抽取物（BS-M）、南柴胡水層粗抽取物（BS-W）以及分離自該 BS-A 萃取物之第八成份（BS-(8)）分別加至人類肝癌細胞株、卵巢癌細胞株、肺癌細胞株、惡性腦膠質細胞瘤以及大腸直腸癌細胞株培養基中，觀察加藥 7 日間各腫瘤細胞株間之抑制情形。本實施例以肺癌細胞株 A549 及大腸直腸癌細胞株 HT-29 為例，當各萃取物投予三日後，加入 60 毫克南柴胡丙酮粗抽取物的腫瘤細胞數（Tumor Cell Counts）降低程度與 600 毫克的南柴胡甲醇粗抽取物所降低的腫瘤細胞數相似，顯示腫瘤抑制成份在 BS-M 層的含量遠較 BS-A 層為低，南柴胡中具腫瘤抑制功效之物質仍然主要保留於南柴胡丙酮萃取物中。

再而，若比較添加各南柴胡萃取物前後，人類肺癌細

胞株 A549 的細胞增生變化，其結果可以利用流式細胞儀 (Flow Cytometry) 來進行偵測。如第 2A 圖至第 2D 圖所示，橫軸代表與抗體接合之腫瘤細胞染色體對數，縱軸係代表 FITC 螢光強度，則從各圖結果可清楚得知未加藥前，肺癌細胞株 A549 主要分佈在 G0/G1 期，但是，當腫瘤細胞加入南柴胡丙酮萃取物 (BS-A) 以及南柴胡甲醇萃取物 (BS-M) 以後，腫瘤細胞會明顯地停滯在 G2/M 期，尤其更以南柴胡丙酮萃取物的功效最為顯著。另一方面，從流式細胞儀的 PI 染色結果，亦發現加入南柴胡萃取物後，G0/G1 期的染色體數量減少，但 G2/M 期的染色體 (2N, 4N 等) 數量卻大為提高，而且該現象在人類肝癌細胞株、卵巢癌細胞株、肺癌細胞株及大腸直腸癌細胞株中均呈現相似結果，顯示南柴胡萃取物的腫瘤抑制機轉極可能與 G2/M 停滯 (G2/M Arrest) 有關。

#### 實例 4：南柴胡萃取物與細胞凋亡 (Apoptosis)

為進一步證實南柴胡萃取物是否具有誘導腫瘤細胞株產生細胞凋零 (Apoptosis) 之功效，本發明較佳實施例於是以流式細胞儀 (Flow Cytometry)、反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 及西方點墨法 (Western Blot) 一同檢視腫瘤細胞株分別加入南柴胡萃取物第八成份以及南柴胡丙酮萃取物以後，腫瘤細胞在細胞週期以及調控蛋白 p21 及 p53 上之變化。

以肺癌細胞株 A549 為例，將未加藥之 A549 細胞株、加入 20  $\mu$ M 異柴胡內酯之 A549 細胞株以及加入 60 微克/毫升南柴胡丙酮萃取物之 A549 細胞株連續培養 48 小時之後，利用流式細胞儀 (Flow Cytometry) 來偵測 Annexin V-FLOUS 與 PI 之間的染色結果。其中，橫軸表示與 Annexin V-FLOUS 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度，而縱軸代表與 PI 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度，結果由第 3A 至 3C 圖可知，控制組 (指未加藥的 A549 腫瘤細胞株) 培養 48 小時後，與 Annexin V 結合 (顯示細胞膜外翻，細胞凋亡之指標) 之細胞數量僅佔 3.8%，然而於 A549 肺癌細胞株中加入異柴胡內酯或南柴胡丙酮粗萃取物後再培養 48 小時，則發現腫瘤細胞與 Annexin V 結合的腫瘤細胞量大幅增加至 32.7%，顯示腫瘤細胞在南柴胡萃取物的作用下能夠誘發細胞凋亡 (Apoptosis) 產生。

因此，從第 4 圖之細胞週期以及第 5 圖西方點墨法結果可知，南柴胡丙酮粗萃取物、以及南柴胡萃取物中之異柴胡內酯對於腫瘤細胞的細胞週期作用機轉與紫杉醇類似，均在有絲分裂成熟階段 (G2/M 期) 停滯住，而且，南柴胡丙酮粗萃取物 (BS-A) 以及柴胡內酯相似物與其衍生物 (BS-3 或 BS-8) 會大幅提高腫瘤抑制蛋白 (Tumor Suppressor) p21 及 p53 產量來阻礙 Cyclin D 及 Cyclin E，藉此阻擋細胞進入 G0/G1 期而使腫瘤細胞停滯於 G2/M 期。

故，由上述結果可知，南柴胡丙酮萃取物以及包含異

柴胡內酯之柴胡內酯類似物及其衍生物具有促使腫瘤細胞停滯在 G2/M 期，俾誘發腫瘤細胞進入細胞凋亡 (Apoptosis) 之功效，且上述現象在人類肝癌、肺癌、卵巢癌、惡性腦瘤以及大腸直腸癌細胞株中均會發生，顯示南柴胡萃取物具有抑制人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦瘤及大腸直腸癌增生之功效，且其作用機轉可能與紫杉醇的作用機轉類似，為一種 G2/M 停滯劑。

若再以西方點墨法來檢測腫瘤細胞株投予南柴胡丙酮萃取物及南柴胡萃取物第八成份以後，細胞骨架 (Cytoskeleton) 之變化。由第 6 圖所示，肺癌細胞株 A549 加入南柴胡丙酮萃取物 12 小時、24 小時及 48 小時期間，細胞骨架中之第一型  $\alpha$ -微小管無明顯變化，但在第五型  $\beta$ -微小管卻逐漸減少，而且，比較加入南柴胡萃取物前後， $\beta$ -微小管是否出現聚集狀態，由第 7 圖結果亦可得知，南柴胡萃取物第八成份加入以後，溶解型 (Soluble form, 指未聚合狀態之  $\beta$ -微小管，圖中以 S 表示) 的蛋白帶消失，而顆粒型 (Particular form, 指聚合以後之  $\beta$ -微小管，圖中以 P 表示) 的蛋白帶增加，顯示南柴胡萃取物與紫杉醇相似，均具有致使  $\beta$ -微小管聚集的功能。

並且，藉由共軛交顯微鏡 (Confocal Microscope) 進一步檢視螢光標定微小管抗體接合到微小管上以後，細胞骨架內紡錘絲的移動情形。其結果第 8 圖所示，當腫瘤細胞加入南柴胡萃取物以後， $\beta$ -微小管產生聚集現象，導致紡錘絲持續拉長，進而阻擋 2 倍數或多倍數染色體向細胞

兩極移動，使腫瘤細胞無法一分為二。如此，腫瘤細胞不僅無法有效地執行有絲分裂，甚至隨著 2N, 4N 染色體不斷累積而導致無效細胞 (Junk Cell) 細胞凋亡。

#### 實例 5: 南柴胡萃取物對於紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株 (Taxol Resistance Tumor Cell Line) 之影響

由於現行藥物對於化療後期具紫杉醇抗藥性的腫瘤細胞並無令人滿意的毒殺效果，而且從上述流式細胞儀 (Flow Cytometry) 結果亦發現，南柴胡丙酮粗抽取物以及異柴胡內酯類似物及其衍生物對於人類肝癌、卵巢癌、惡性腦癌、肺癌及大腸直腸癌的腫瘤抑制機轉與紫杉醇近似，因此，本發明冀以南柴胡萃取物作為新藥篩選來源，進一步檢視南柴胡萃取物對於紫杉醇抗藥性細胞株的毒殺效果。

以下，本發明實施例將以人類肺癌細胞株 A549 繼帶培養所產生之紫杉醇抗藥性肺癌細胞株 A549-T12 為例，來試驗南柴胡丙酮萃取物 (BS-A)、南柴胡萃取物第八成份及第十五成份 (BS-8, BS-15)，各代表柴胡內酯及與柴胡內酯相關之類似衍生物) 對於 A549-T12 細胞株之影響，並運用流式細胞儀、藥物毒性試驗以及組織切片來評估南柴胡萃取物對於紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株之毒殺效果。

如第 9A 至 9D 圖所示，比較控制組 (未加藥之 A549-T12) 以及加入 100 nM 紫杉醇、30 微克/毫升 BS-A、8 微克/毫升 BS-8 及 8 微克/毫升 BS-15 之 A549-T12 在流

式細胞儀下，Annexin V-FLOUS 與 PI 之間的變化。其中，橫軸表示與 Annexin V-FLOUS 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度，而縱軸代表與 PI 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度，結果顯示控制組（指未加藥的紫杉醇抗藥性腫瘤細胞株 A549-T12）培養 48 小時後，與 Annexin V 結合之細胞數量僅佔 6.8%，然於 A549-T12 細胞株中分別加入異柴胡內酯、柴胡內酯衍生物或南柴胡丙酮粗提取物後再培養 48 小時後，則發現腫瘤細胞與 Annexin V 結合的腫瘤細胞量大幅增加 30.6%、23.1% 及 24%，顯示異柴胡內酯對於誘發紫杉醇抗藥性細胞株產生細胞凋亡的能力較其他柴胡內酯衍生物更佳，而且，南柴胡丙酮萃取物經過純化後，促進腫瘤細胞產生細胞凋零的效果較粗萃取物狀態更為顯著。

再者，從細胞毒性測試結果可知，當添加南柴胡丙酮粗提取物（BS-A）、柴胡內酯類似物（BS-8）以及柴胡內酯衍生物（BS-15）至紫杉醇抗藥性肺癌細胞株 48 小時以後，如第 10A 至 10C 圖所示，腫瘤細胞存活率均明顯降低，且經過純化取得的柴胡內酯類似物毒殺腫瘤細胞的效果，從細胞或動物的有效半數致死量（ $IC_{50}$  或  $ED_{50}$ ）上來看，皆遠小於丙酮萃取物。顯示包含柴胡內酯、異柴胡內酯在內之柴胡內酯類似物及其衍生物，係南柴胡丙酮粗提取物裡抑制腫瘤成份的主要活性物質，而且，經過分離以後之南柴胡萃取物只需要極低的劑量（1.5 微克/毫升）便能引起腫瘤細胞凋亡。

## 實例 6：南柴胡萃取物在生物體內 (in vivo) 抑癌效果評估

如以組織切片進一步檢視南柴胡萃取物對於生物體內 (in vivo) A549 細胞株及紫杉醇抗藥性腫瘤細胞 (A549-T12) 之抑制情形。如第 11A 圖、第 11B 圖以及第 12A 圖和第 12B 圖所示，從放大 100 倍的蘇木紫與伊紅染色法 (Haematoxylin and Eosin Stain, H&E Stain) 組織切片結果比較使用 BS-A 治療前後腫瘤組織的壞死情形，其結果發現，投予動物每公斤 300 毫克以上之 BS-A 以後，腫瘤細胞於細胞核部分發生裂解，淋巴球浸潤且產生大片腫瘤細胞出血性壞死；從第 12B 圖更顯示經過 BS-A 治療以後，原本密集分布的腫瘤細胞只剩下數顆腫瘤細胞。同時，從第 13A 圖皮下腫瘤組織 (A549 細胞株) 比較圖亦顯示，經過每公斤 500 毫克劑量的南柴胡萃取物投予，動物皮下的腫瘤體積明顯縮小 77% (腫瘤直徑由 13 微米縮小為 3 微米)，且從相對腫瘤體積來看，如第 13B 圖所示，以南柴胡萃取物治療腫瘤後，腫瘤增大的速度亦會明顯趨緩。因此，從組織切片及皮下腫瘤組織可以得知，南柴胡萃取物對於生物體內的腫瘤組織具有顯著的毒殺效果，並能控制腫瘤體積的擴張速度。

## 實例 7：南柴胡萃取物在細胞毒性及動物毒性方面之影響

從本發明實驗結果偵知，南柴胡丙酮粗抽取物 (60 微克/毫升) 對於人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦瘤以及大

腸直腸癌細胞株具顯著抑制功效，且在組織切片及皮下腫瘤試驗中，亦證實南柴胡萃取物可以毒殺生物體 (in vivo) 內的腫瘤組織。故為進一步測量南柴胡萃取物在執行腫瘤毒殺效果的同時，對於其他正常細胞或器官是否具有傷害性，以評估南柴胡萃取物作為新藥來源之可能，本發明以清醒鼠為例來顯示投予每公斤 400 微克之南柴胡萃取物以後，鼠體各器官生化指標酵素的變化。

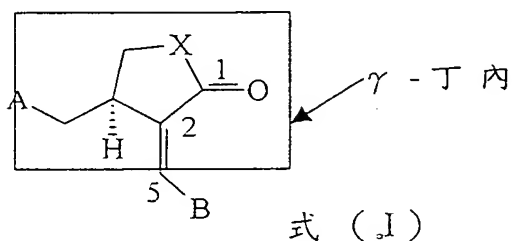
如第 14 圖及第 15 圖所示，於活體狀態下靜脈投予每公斤 400 微克劑量之南柴胡丙酮萃取物至清醒鼠體內 72 小時以後，在胰臟功能指標酵素脂解酶 (Lipase)、澱粉酶 (Amylase)，肝臟功能指標酵素葡萄糖氧化酶 (GOT)、葡萄糖磷酸轉化酶 (GPT)，心臟功能指標酵素乳酸脫氫酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH)、肌酐酸激酶 (Creatinine Kinase, CK)，腎臟功能指標肌酐酸 (Creatinine)、血清尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 等各類生化值，以及心搏、舒張壓、收縮壓、血小板以及白血球方面，均無異於未投藥之控制組，顯示南柴胡萃取物的投予並不會對生物體內的消化系統、循環系統、代謝系統、造血機能及生殖細胞造成毒害。而且，從第 15 圖的肝、腎組織切片亦能佐證連續五日腹腔內投予南柴胡萃取物每公斤 300 微克以後，正常肝細胞及腎細胞並不會受到破壞。另一方面，由於南柴胡丙酮萃取物或異柴胡內酯對於活體動物的腫瘤細胞端粒酶 (Telomerase) 的活性具明顯抑制功效，因此，綜合上述結果可以清楚得知，南柴胡萃取物投予生物體後



並不會影響正常細胞功能或器官運作，但對包含紫杉醇抗藥性細胞株在內之腫瘤細胞卻具有高度專一性的毒殺效果，故，以南柴胡萃取物或其藥物上可接受之鹽、酯、酮及其衍生物作為治療藥物，可以有效解決現行藥物對於紫杉醇抗藥性腫瘤細胞毒殺效果不彰的問題，而為化療後期紫杉醇逐漸失效的患者提供一種新的抗腫瘤藥劑來源。

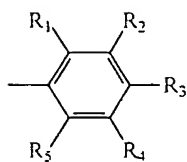
### 結論

綜上而言，以本發明萃取方法分離取得之南柴胡萃取物，係以包含如通式 (I)，具  $\gamma$ -丁內酯結構，碳 2(5) 呈 Z 構型或 E 構型之雜環化合物之南柴胡丙酮萃取物，以及分離自該南柴胡丙酮萃取物，而以異柴胡內酯為代表之柴胡內酯類似物與其衍生物，或其藥物上可接受之鹽、酯、酮與其衍生物作為治療人類肝癌、卵巢癌、肺癌、惡性腦瘤及大腸直腸癌之腫瘤抑制活性成份。



其中， $X = N, O, S, Se$ ；

A, B 係分別選自具有下式之取代基：



其中，R1，R2，R3，R4，R5 係分別選自氫原子、鹵原子、羥基、硫氫基、胺基、烷氧基及硝基。

惟從本發明之較佳實施例可知，南柴胡萃取物經過分離、純化得到的異柴胡內酯較丙酮粗抽取物具有更佳的腫瘤抑制效果，而且，投予南柴胡萃取物以後，不論在一般腫瘤細胞或紫杉醇抗藥性腫瘤細胞，其抑制腫瘤端粒酶活性、縮小相對腫瘤體積、抑制腫瘤細胞增生以及促進腫瘤細胞凋零方面均具有顯著功效，並在不影響生物體正常消化系統、循環系統、代謝系統、造血系統以及生殖泌尿系統的狀態下，高度專一性地毒殺腫瘤細胞。

再者，由細胞調控的觀點來看，南柴胡丙酮萃取物係為一種促使細胞骨架之 $\beta$ -微小管聚集，使拉長的紡錘絲無法向兩極牽引而導致細胞凋亡之微小管穩定劑 (Microtubule Stabilizing Agent)，且其作用機轉與紫杉醇類似，可以促使腫瘤細胞之有絲分裂停滯在 G2/M 期，而達到控制腫瘤細胞增生之功效。

上述實施例僅為例示性說明本發明之原理及其功效，而非用於限制本發明。任何熟習此技藝之人士均可在不違背本發明之精神及範疇下，對上述實施例進行修飾與變化。因此，本發明之權利保護範圍，應如後述之申請專利範圍所列。

#### 【圖式簡單說明】：

第 1 圖係顯示以本發明萃取方法分離南柴胡所取得之

南柴胡丙酮粗提取物 (BS-A)、南柴胡甲醇粗提取物 (BS-M) 以及南柴胡水層粗提取物 (BS-W) 進行細胞毒性試驗 (MTT Assay) 後，腫瘤細胞存活率與南柴胡投藥劑量間之變化示意圖；

第 2A 圖至第 2D 圖係顯示以本發明萃取方法分離南柴胡所取得之南柴胡丙酮粗提取物 (BS-A)、南柴胡甲醇粗提取物 (BS-M) 以及南柴胡水層粗提取物 (BS-W) 加至肺癌細胞株 A549 且以流式細胞儀檢測後，各種南柴胡萃取物對於腫瘤細胞株之細胞週期波峰示意圖；

第 3A 圖至第 3C 圖係顯示人類肺癌細胞株 A549 在未加藥、加入異柴胡內酯  $20\ \mu\text{M}$  及柴胡丙酮萃取物 60 微克/毫升連續培養 48 小時後，經流式細胞儀測得之 Annexin V - FLOUS 細胞凋亡象限圖 (橫軸表示與 Annexin V-FLOUS 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度，而縱軸代表與 PI 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度)；

第 4 圖係顯示人類肺癌細胞株 A549 在未加藥 (控制組)、加入南柴胡丙酮粗提取物 (BS-A)、南柴胡萃取物第八成份 (BS-8) 以及紫杉醇的作用下，經流式細胞儀測得之細胞週期變化分析圖；

第 5 圖係顯示人類肺癌細胞株 A549 在未加藥 (C)、加入南柴胡丙酮萃取物 (BS-A)、南柴胡甲醇萃取物 (BS-M)、南柴胡水層萃取物 (BS-W)、南柴胡萃取物第八成份 (BS1)、南柴胡萃取物第三成份 (BS2) 一日或三日後，測試腫瘤抑制蛋白 (Tumor Suppressor) p21 以及

p53 含量之西方點墨法 (Western Blot) 示意圖；

第 6 圖係顯示人類肺癌細胞株 A549 在未加藥 (C)、加入南柴胡丙酮萃取物 12 小時、24 小時及 48 小時以後，測試腫瘤細胞細胞骨架中，第一型  $\alpha$ -微小管以及第五型  $\beta$ -微小管之西方點墨法示意圖；

第 7 圖係顯示人類肺癌細胞株 A549 在未加藥 (A549)、加入南柴胡萃取物第八成份、紫杉醇以及 Vinca 植物鹼之後，測試腫瘤細胞  $\beta$ -微小管在溶解型 (Soluble form, 以 S 表示) 或顆粒型 (Particular form, 以 P 表示) 之西方點墨法示意圖；

第 8 圖係顯示人類肺癌細胞株 A549 在加入南柴胡萃取物之後，紡錘絲呈現拉長狀態之共軛交顯微鏡 (Confocal Microscope) 螢光標定切片圖；

第 9A 圖至第 9D 圖係顯示人類肺癌紫杉醇抗藥性細胞株 A549-T12 在未加藥、加入南柴胡丙酮粗抽取物 (BS-A)、南柴胡萃取物第八成份 (BS-8) 以及南柴胡萃取物第十五成份 (BS-15) 24 小時之後，經流式細胞儀測得之 Annexin V - FLOUS 細胞凋亡象限圖 (橫軸表示與 Annexin V-FLOUS 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度，而縱軸代表與 PI 抗體接合之腫瘤細胞螢光強度)；

第 10A 圖至第 10C 圖係顯示人類肺癌紫杉醇抗藥性細胞株 AT-12 在加入南柴胡丙酮萃取物 (BS-A)、南柴胡萃取物第八成份 (BS-8) 及南柴胡萃取物第十五成份 (BS-15) 24 小時以及 48 小時期間，腫瘤細胞之細胞毒性試驗

(MTT Assay) 示意圖；

第 11A 圖係顯示裸鼠皮下植 A549 細胞株(控制組)，放大 100 倍並經蘇木紫與伊紅染色法 (Haematoxylin and Eosin Stain, H&E Stain) 處理後之組織切片示意圖；

第 11B 圖係顯示於裸鼠皮下植入 A549 細胞株，連續五天投予腹腔內注射 500 毫克/公斤南柴胡丙酮萃取物，第七天之腫瘤經放大 100 倍以及蘇木紫與伊紅染色法 (Haematoxylin and Eosin Stain, H&E Stain) 處理後，出現大片腫瘤組織出血性壞死之組織切片示意圖；

第 12A 圖係顯示裸鼠皮下植入 A549-T12 細胞株(控制組)，放大 100 倍並經蘇木紫與伊紅染色法 (Haematoxylin and Eosin Stain, H&E Stain) 處理後之組織切片示意圖；

第 12B 圖係顯示於裸鼠皮下植入 A549-T12 細胞株，連續五天投予腹腔內注射 400 毫克/公斤南柴胡丙酮萃取物，第七天之腫瘤經放大 100 倍以及蘇木紫與伊紅染色法 (Haematoxylin and Eosin Stain, H&E Stain) 處理後，出現大片組織纖維化及只剩餘若干腫瘤細胞；

第 13A 圖係顯示裸鼠皮下植入 A549 細胞株形成腫瘤，連續五天投予腹腔內注射 400 毫克/公斤之 BS-A 治療，第七日後與未加藥之控制組相較，其皮下腫瘤直徑之局部放大照片；

第 13B 圖係顯示活體狀態下，以每公斤體重 500 毫克之南柴胡丙酮粗抽取物腹腔注射投予實驗動物，並比較未加藥控制組與加藥治療組在相對腫瘤體積與治療天數間之

變化示意圖；

第 14 圖係顯示以每公斤體重 400 毫克之南柴胡萃取物投予清醒鼠 72 小時期間，胰臟、肝臟、心臟、腎臟及造血組織各功能之生化指標酵素變化示意圖；

第 15 圖係顯示以靜脈注射每公斤體重 400 毫克之南柴胡萃取物投予清醒鼠 72 小時期間，血小板、白血球、淋巴球之變化示意圖；

第 16 圖係顯示以靜脈注射每公斤體重 400 毫克之南柴胡萃取物投予清醒鼠 72 小時期間，心搏、收縮壓、舒張壓及平均壓之變化示意圖；以及

第 17 圖係以連續五日腹腔內注射每公斤體重 300 毫克之南柴胡萃取物投予清醒鼠之後，其肝臟細胞及腎臟細胞之組織切片圖。

(本案無元件符號)

## 拾、申請專利範圍：

1. 一種從南柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium*) 中分離出用於對抗細胞細胞增生性疾病 (Cell Proliferative Disorder) 之活性成份之南柴胡萃取方法，該萃取方法係包括：

抽提南柴胡以取得木脂素 (Lignan) 混合物，其中，該木脂素混合物係包含有至少一種可抑制腫瘤增生之活性成份；以及分離該抑制腫瘤增生之活性成份，以得到單一類型之南柴胡萃取物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，從南柴胡中抽提出該木脂素混合物之方法，復包括以極性 (Polarity) 互異之第一、第二、第三及第四溶液來執行以下步驟：

以第一溶液溶抽粉碎後之南柴胡，分離取得南柴胡第一萃取物及殘渣；

以第二溶液溶抽殘渣，分離取得南柴胡第二萃取物；

以第三溶液抽提該南柴胡第一萃取物，並且脫除抽提水層中之醇類；以及

以第四溶液抽提該脫除醇類之抽提水層，並予以濃縮。

3. 如申請專利範圍第 2 項之南柴胡萃取方法，其中，該第一溶液係為丙酮。
4. 如申請專利範圍第 2 項之南柴胡萃取方法，其中，該第

二溶液係為甲醇。

5. 如申請專利範圍第 2 項之南柴胡萃取方法，其中，該第三溶液係為 95% 甲醇水溶液。
6. 如申請專利範圍第 2 項之南柴胡萃取方法，其中，該第四溶液係為氯仿 (Chloroform)。
7. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，復包括以層析法 (Chromatography) 分離該腫瘤抑制增生之活性成份。
8. 如申請專利範圍第 7 項之南柴胡萃取方法，其中，該層析法係為矽膠層析法 (Silica Gel Chromatography)。
9. 如申請專利範圍第 7 項之南柴胡萃取方法，其中，該層析法係為製備型高效能液相層析法 (preparative High Performance Liquid Chromatography, preparative HPLC)。
10. 如申請專利範圍第 7 項之南柴胡萃取方法，其中，該層析法係為中壓液相層析法 (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC)。
11. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，復包括以質譜 (Mass Spectrum) 及核磁共振圖譜 (Nuclear Magnetic Resonance Spectrum) 鑑定各單一類型南柴胡萃取物之分子量及其結構。
12. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該細胞增生性疾病係為人類肝癌 (Hepatoma)。
13. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該細



胞增生性疾病係為人類卵巢癌 (Ovarian Cancer)。

14. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該細胞增生性疾病係為人類惡性腦膠質細胞瘤 (Human Malignant Glioblastoma)。

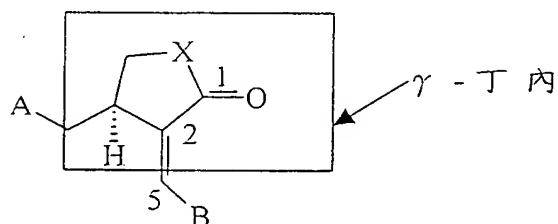
15. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該細胞增生性疾病係為人類肺癌 (Lung Cancer)。

16. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該細胞增生性疾病係為人類大腸直腸癌 (Colorectal Cancer)。

17. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該細胞增生性疾病對於紫杉類 (Taxane) 治療劑具抗藥性。

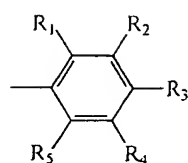
18. 如申請專利範圍第 17 項之南柴胡萃取方法，其中，該紫杉類治療劑係為紫杉醇 (Paclitaxel)。

19. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該抑制腫瘤增生之活性成份係包括至少一種具以下通式之雜環化合物，或包含有如下式之藥物上可接受之鹽、酯、酮或其衍生物：



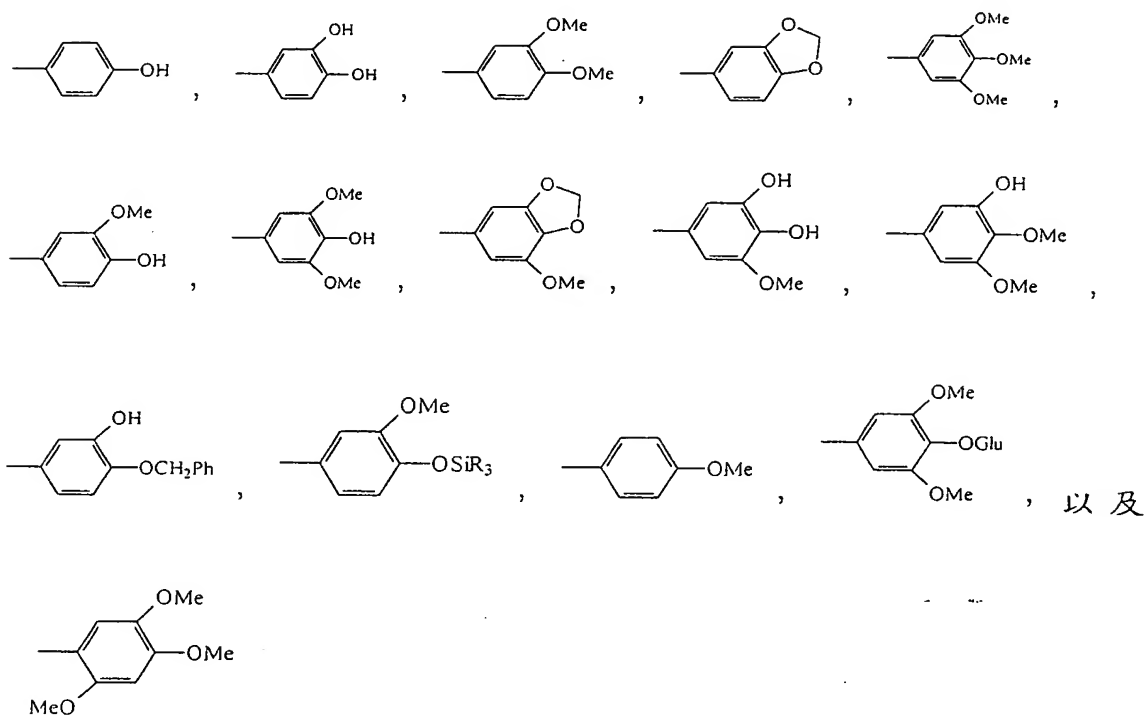
其中， $X = N, O, S, Se$ ；

A, B 係分別選自具有下式之取代基：



其中，R1, R2, R3, R4, R5 係分別選自氫原子、鹵原子、羥基、硫氫基、胺基、烷氧基及硝基。

20. 如申請專利範圍第 19 項之南柴胡萃取方法，其中，該 A, B 取代基係選自以下之取代基結構：

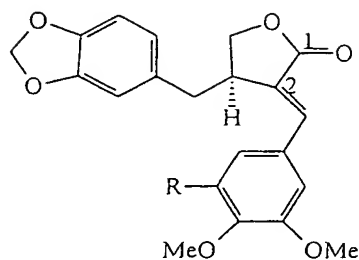


21. 如申請專利範圍第 19 項之南柴胡萃取方法，其中，該雜環化合物係在碳 2(5)處呈 Z 構型。

22. 如申請專利範圍第 19 項之南柴胡萃取方法，其中，該雜環化合物係在碳 2(5)處呈 E 構型。

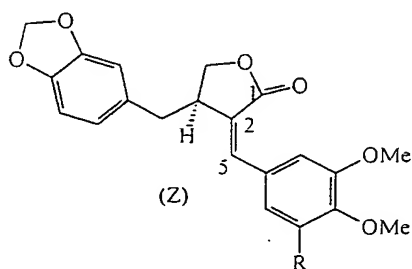
23. 如申請專利範圍第 19 項之南柴胡萃取方法，其中，該雜環化合物具以下通式者係命名為柴胡內酯

( Chaihulactone ) :



其中，R 代表烷氧基。

24. 如申請專利範圍第 19 項之南柴胡萃取方法，其中，該雜環化合物具以下通式者係命名為異柴胡內酯 ( Isochaihulactone ) :



其中，R 代表氫原子、烷氧基或芳基。

25. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該抑制腫瘤增生之活性成份係為一種調控細胞週期 ( Cell Cycle ) 之 G2/M 停滯劑。

26. 如申請專利範圍第 1 項之南柴胡萃取方法，其中，該抑制腫瘤增生之活性成份係為一種促使細胞骨架之  $\beta$ -微小管聚集之微小管穩定劑 ( Microtubule Stabilizing Agent )。

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

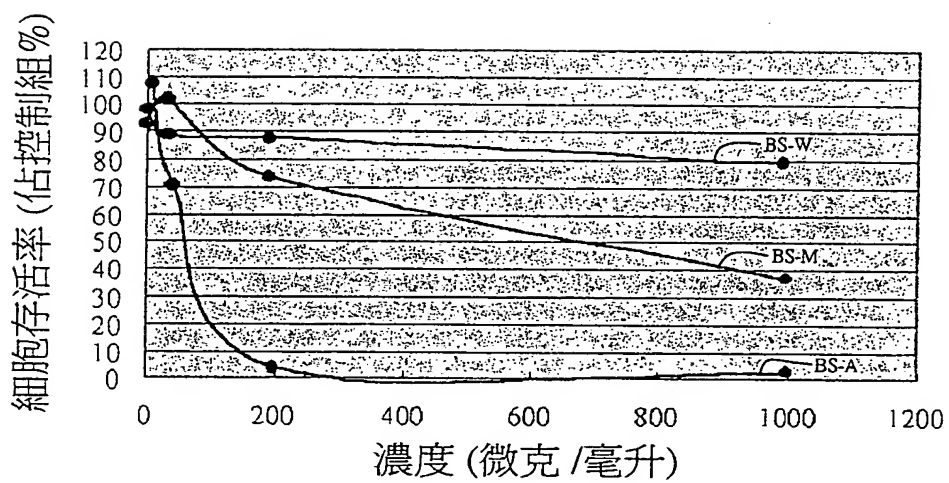
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

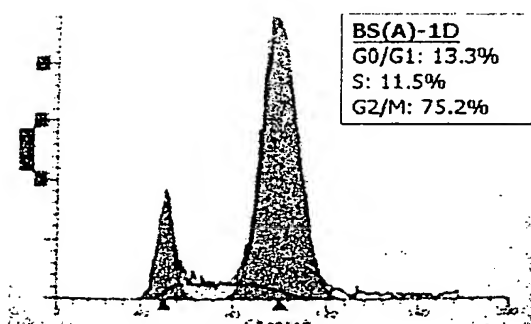
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

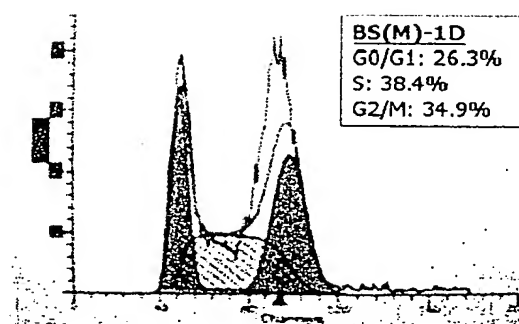
**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



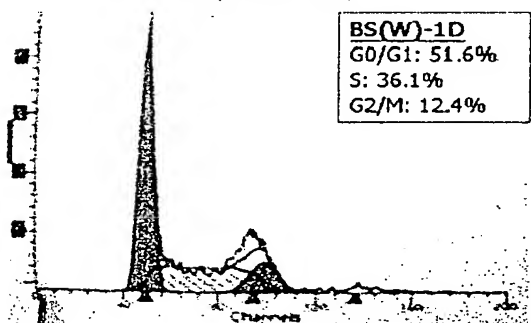
第 1 圖



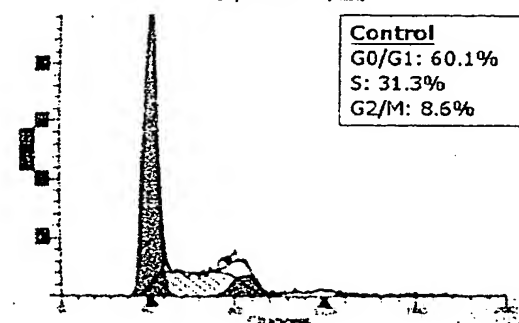
第 2A 圖



第 2B 圖

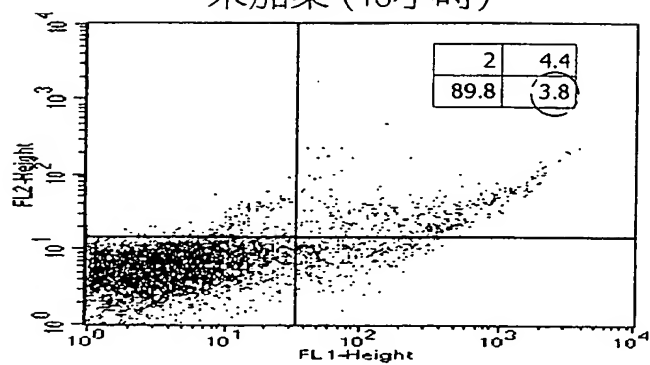


第 2C 圖

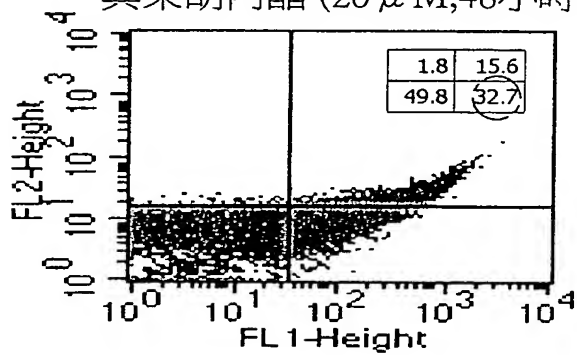


第 2D 圖

未加藥 (48小時)

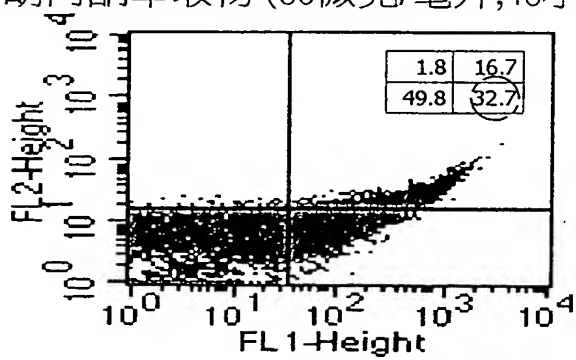


第 3A 圖

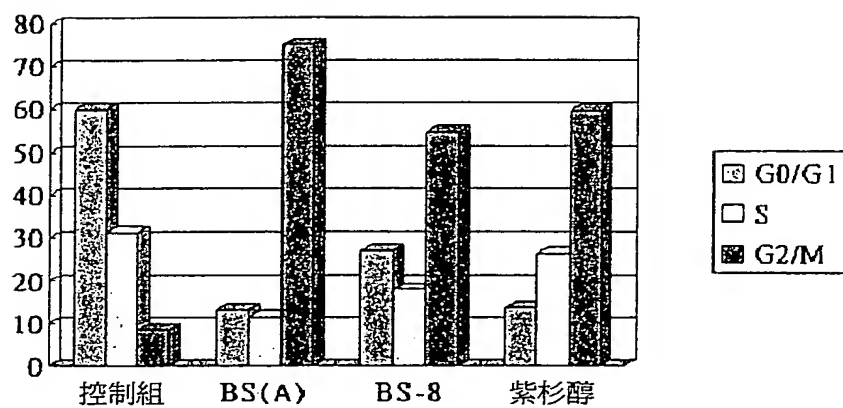
異槲皮素 (20  $\mu$  M, 48小時)

第 3B 圖

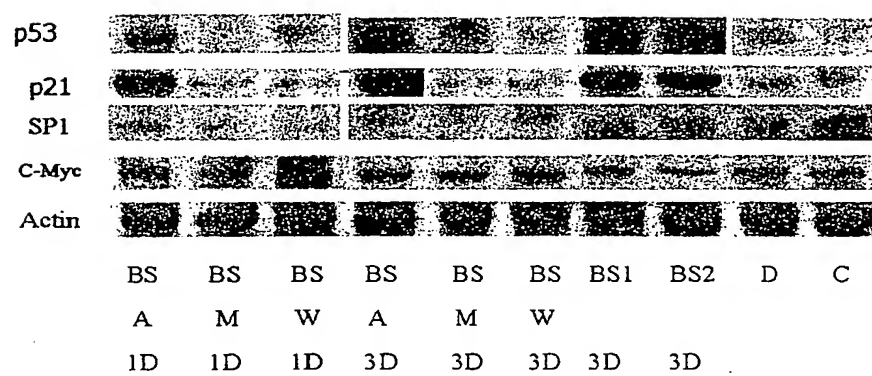
槲皮素丙酮萃取物 (60微克/毫升, 48小時)



第 3C 圖



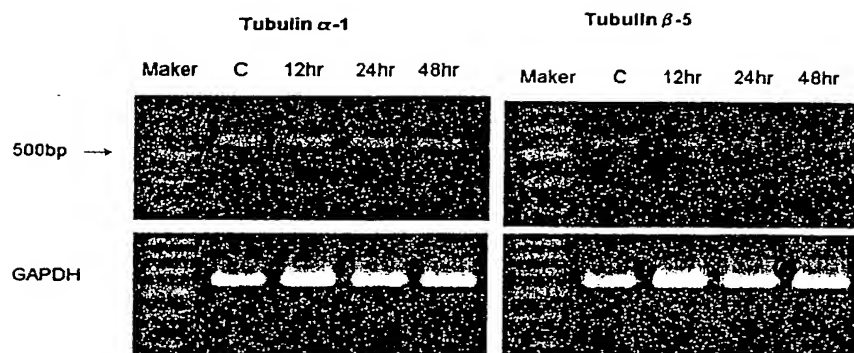
第 4 圖



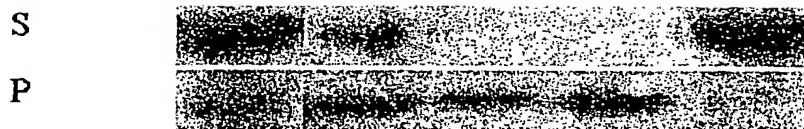
第 5 圖



## A549 Control vs BS(A)

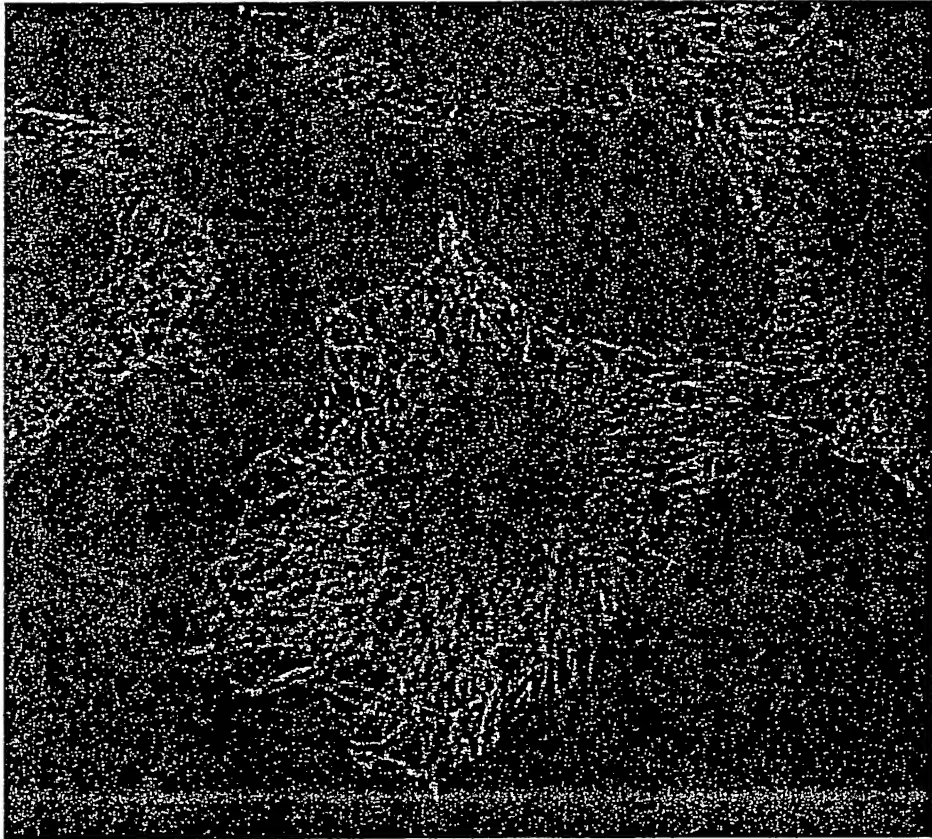


第 6 圖

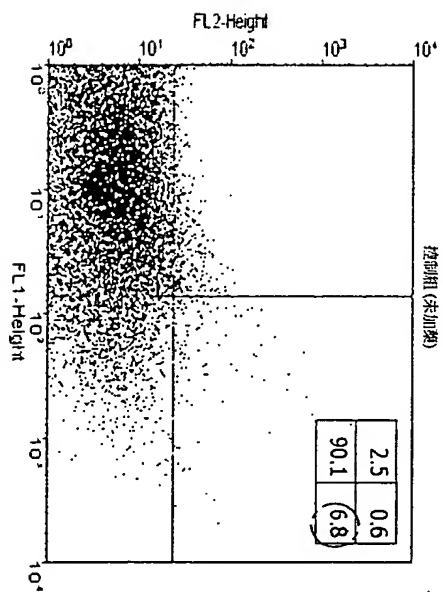


A549 BS(A) BS(8) 紫杉醇 Vinca植物鹼

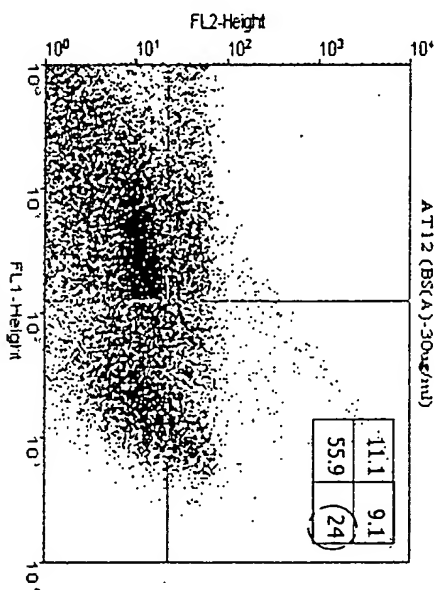
第 7 圖



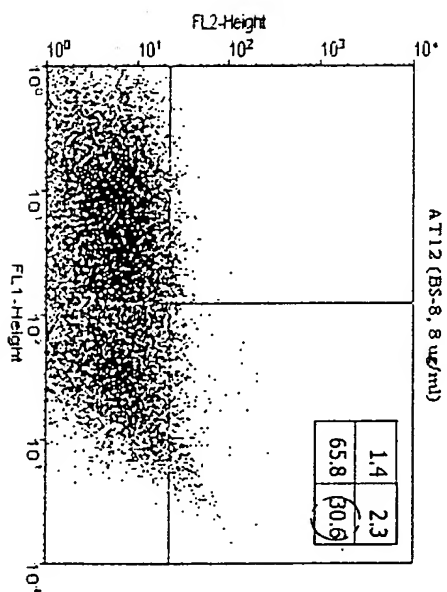
第 8 圖



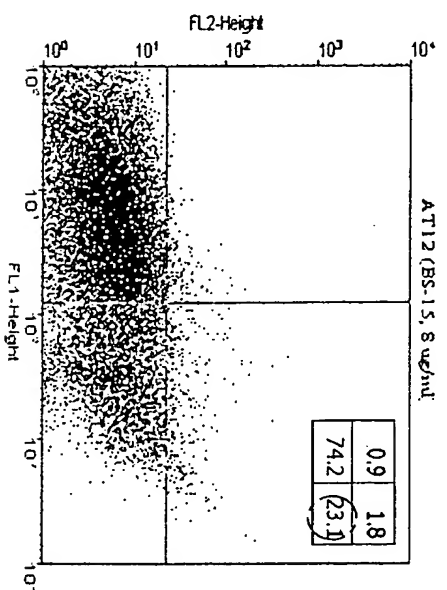
第9A圖



第9B圖

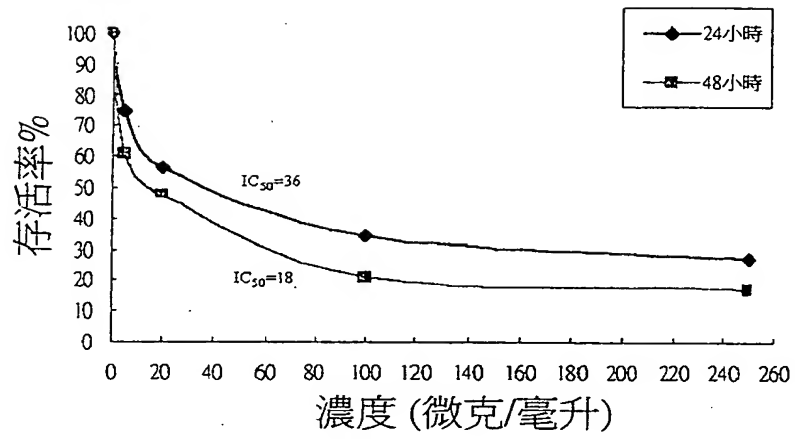


第9C圖



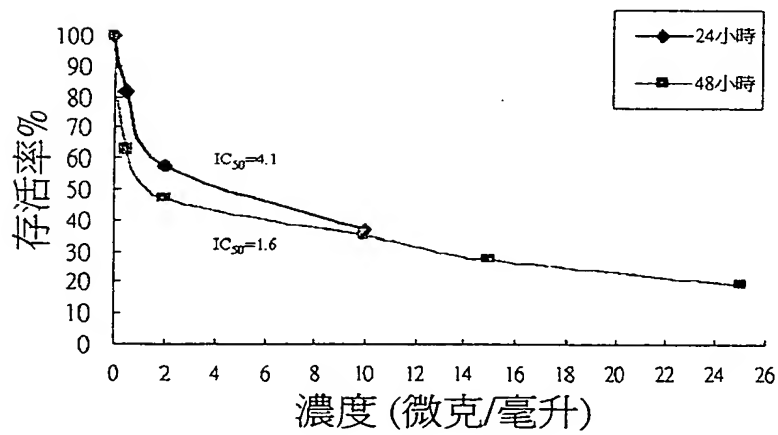
第9D圖

## BS(A)-AT12

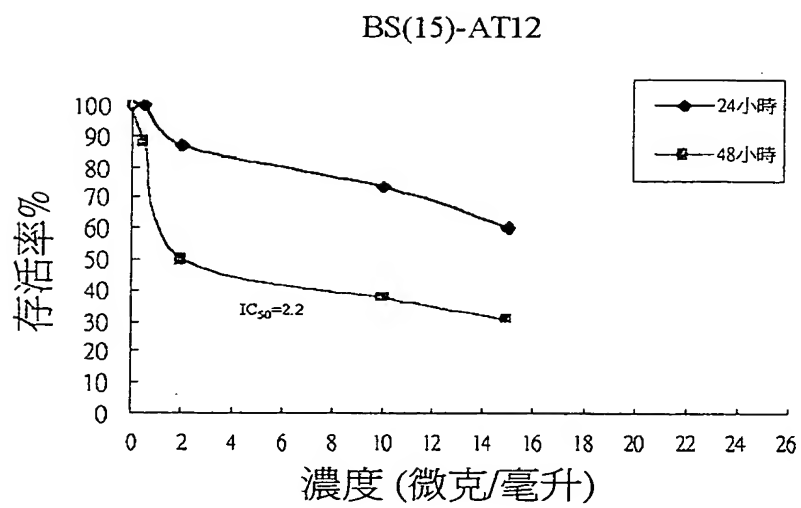


第 10A 圖

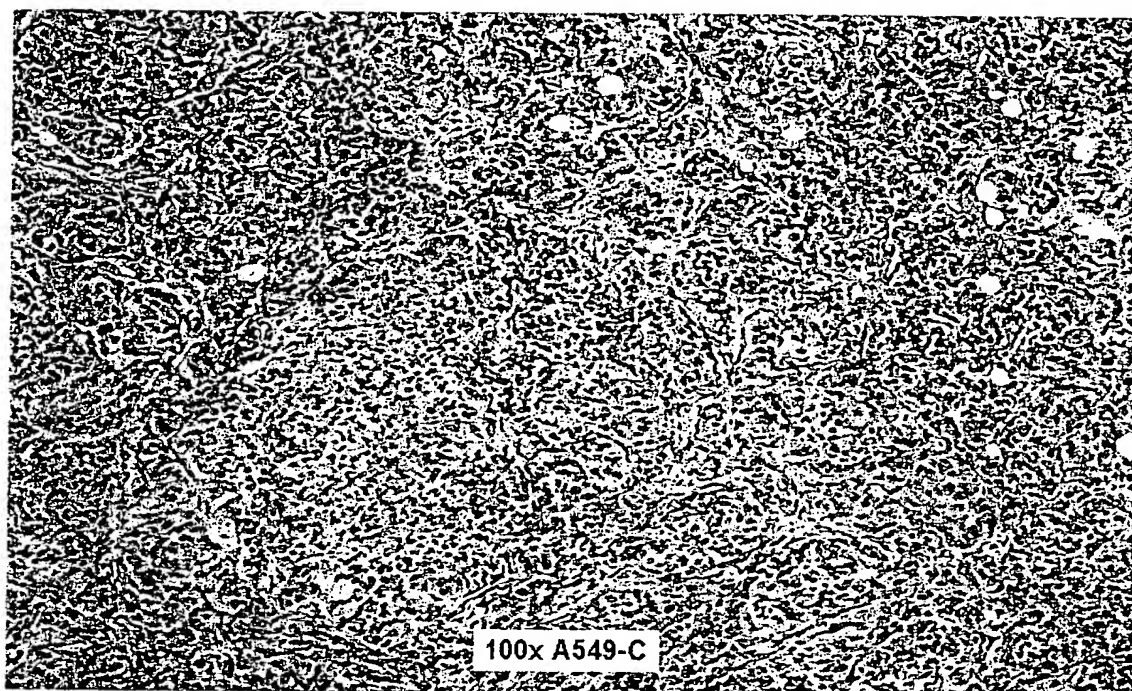
## BS(8)-AT12



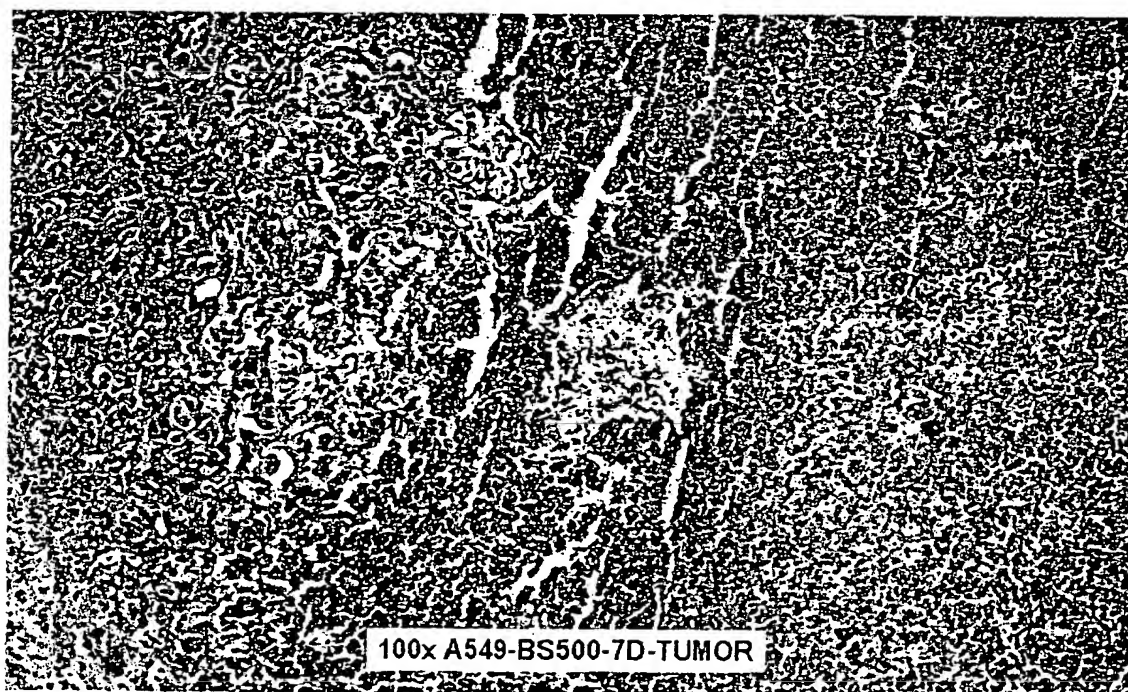
第 10B 圖



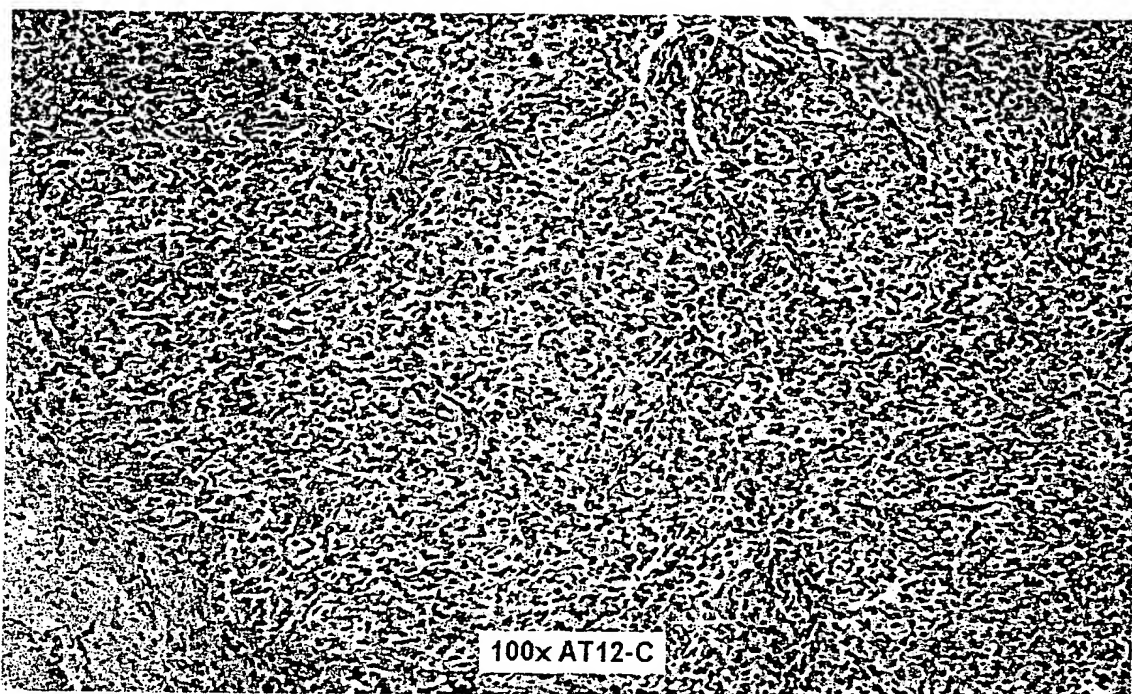
第 10C 圖



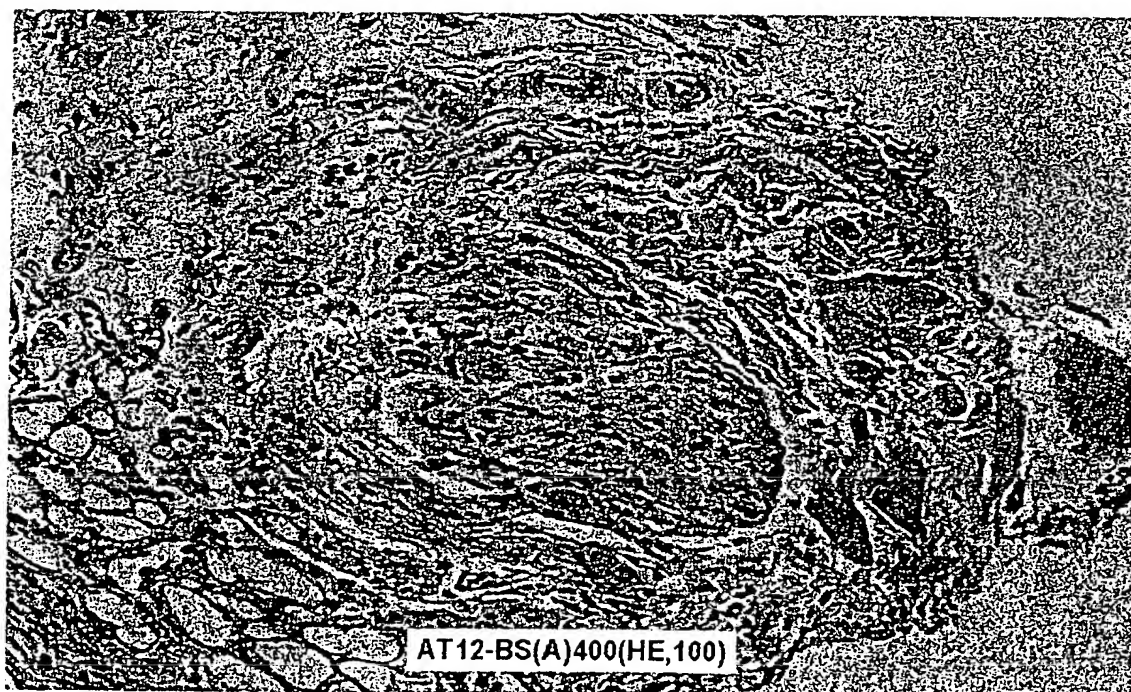
第 11A 圖



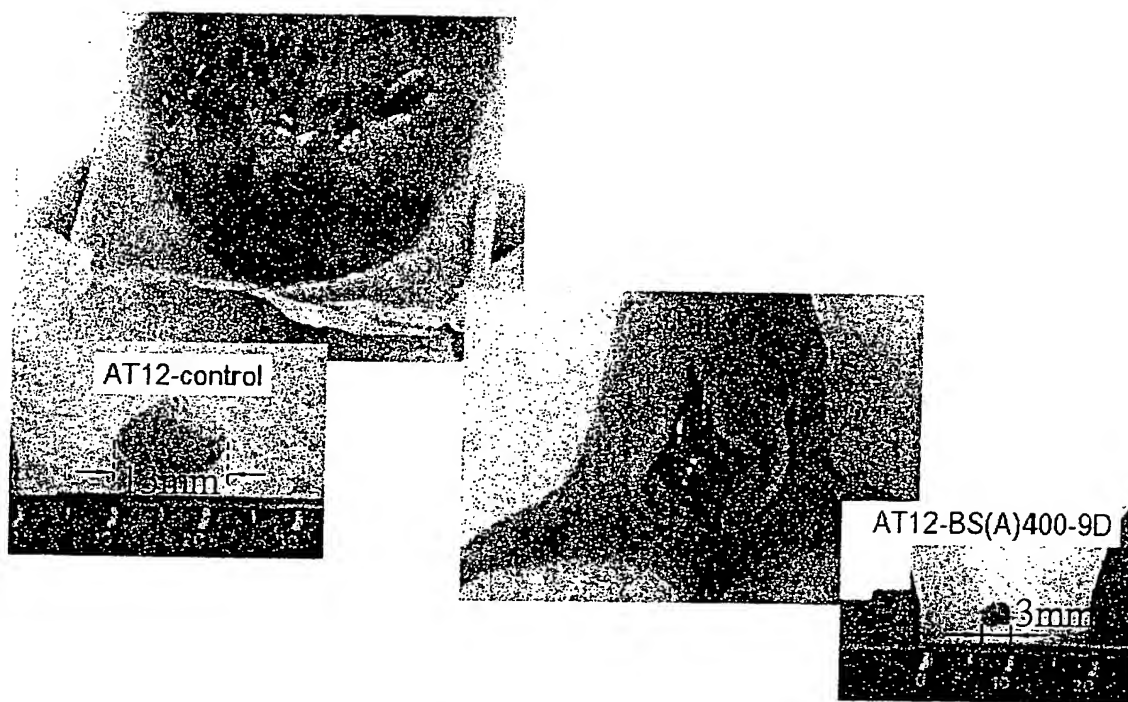
第 11B 圖



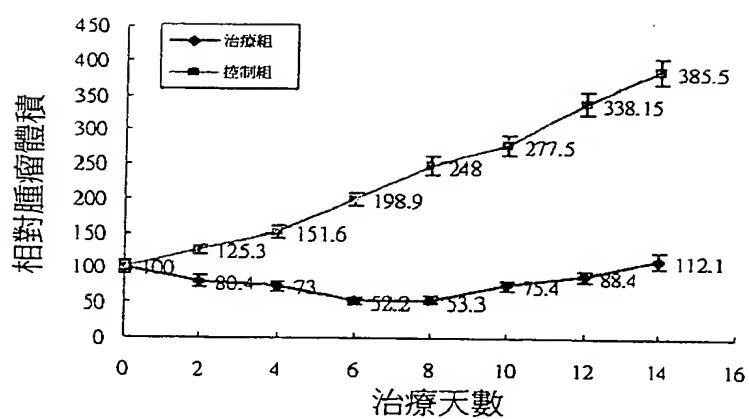
第 12A 圖



第 12B 圖

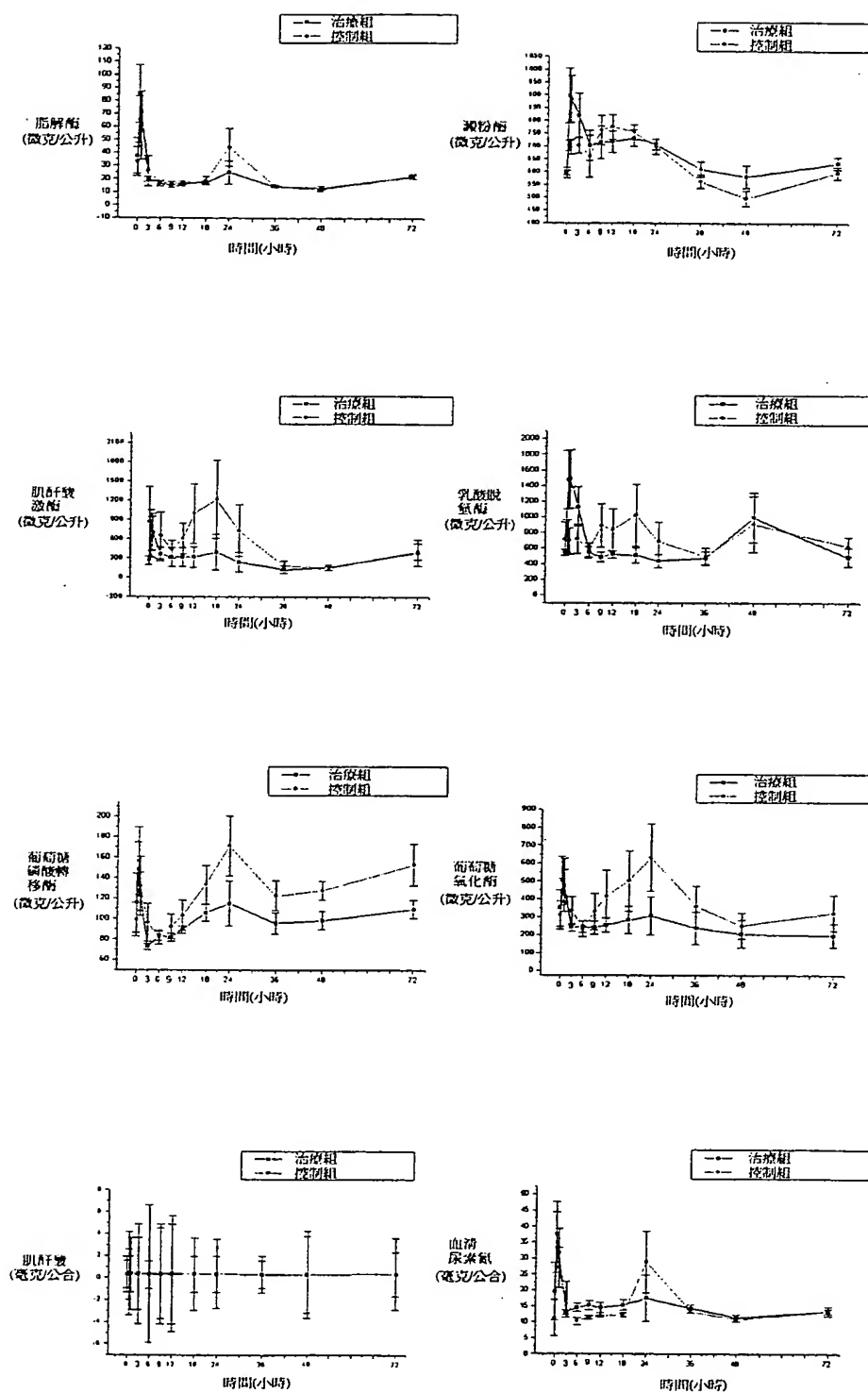


第 13A 圖 (代表圖)

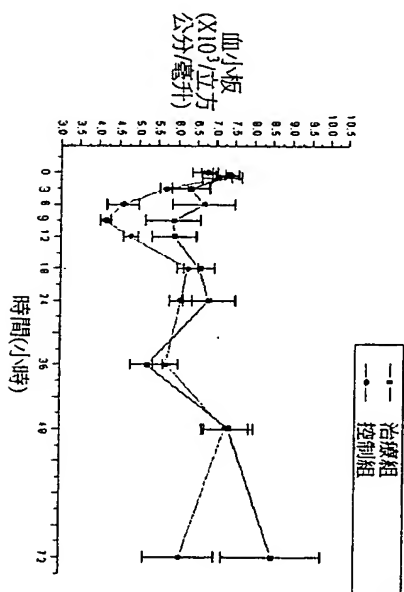
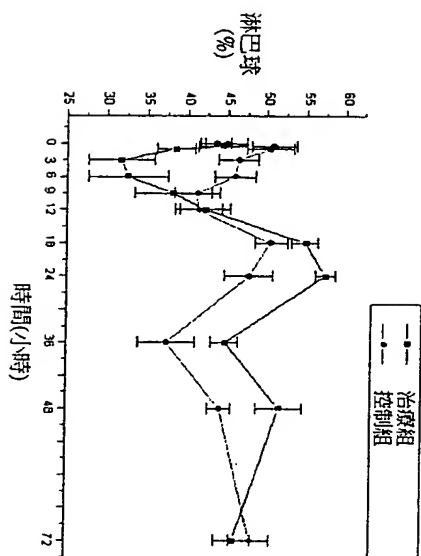
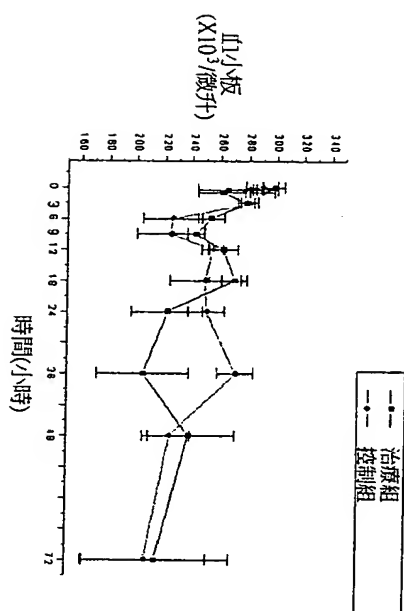


第 13B 圖

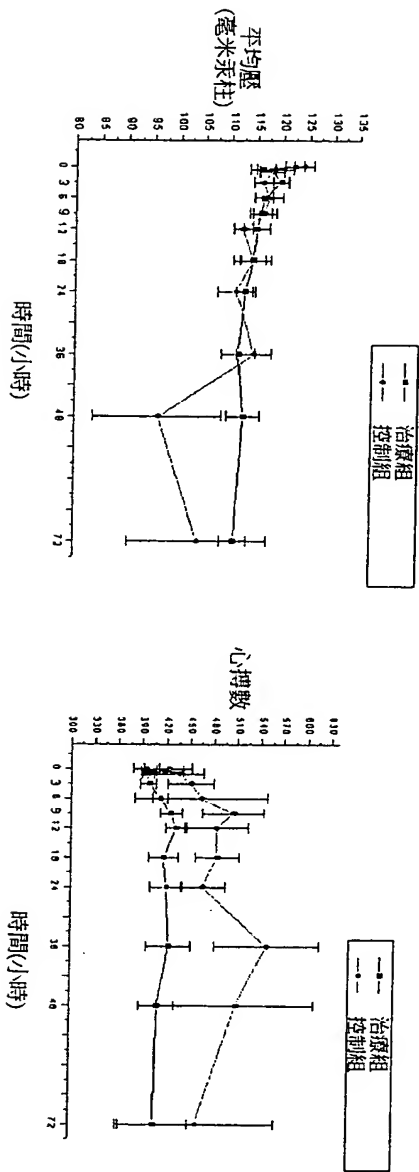
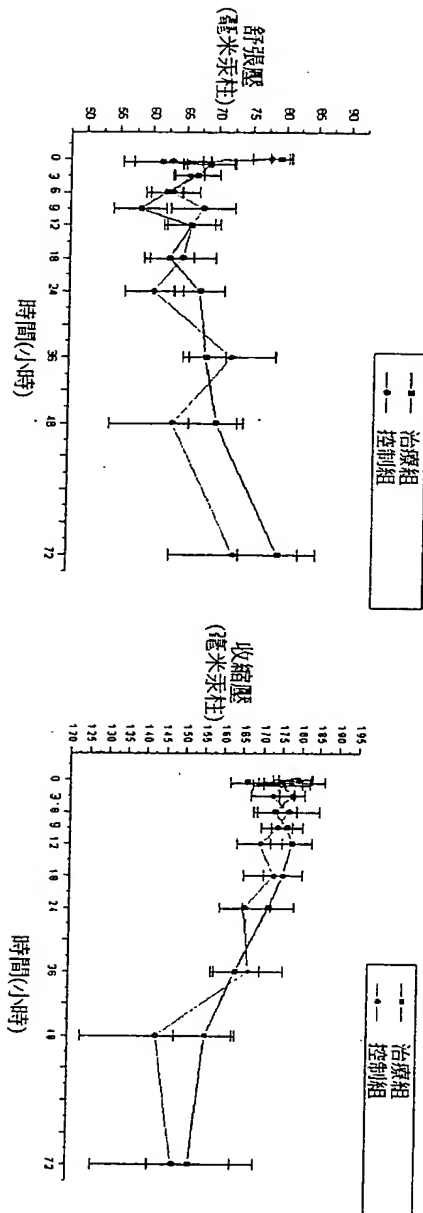




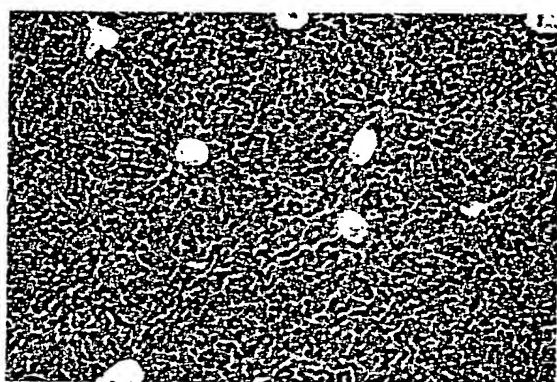
第 14 圖



第 15 圖

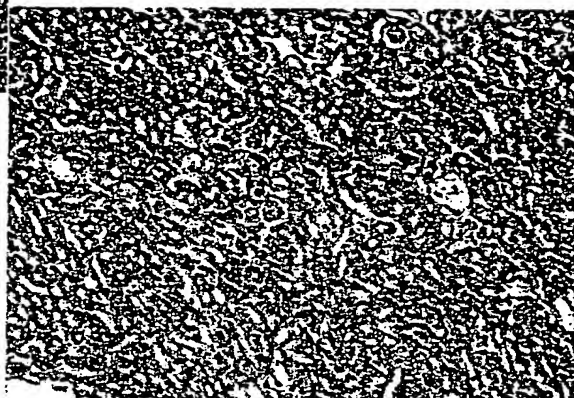


第 16 圖



肝臟

BS-A 300毫克/公斤體重



腎臟

第 17 圖